

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

JOANA CAROLINA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS ANÁLOGOS DA
MILTEFOSINA *IN VIVO***

Alfenas/MG

2018

JOANA CAROLINA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS ANÁLOGOS DA
MILTEFOSINA *IN VIVO***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Alfenas de Minas Gerais. Área de concentração: Interação: Patógeno-hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Alfenas/MG

2018

Silva, Joana Carolina da.

Avaliação da atividade leishmanicida no contexto *in vivo* de compostos análogos da miltefosina / Joana Carolina da Silva. -- Alfenas, MG, 2018.
68 f. : il. –

Orientador: Marcos José Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Fenômenos do Sistema Imunológico. 3. Citocinas. I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD 616.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



JOANA CAROLINA DA SILVA

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA NO CONTEXTO *IN VIVO* DE
COMPOSTOS ANÁLOGOS DA MILTEFOSINA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 17 de julho de 2018.

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

Instituição: USP

Assinatura:

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

RESUMO

O tratamento quimioterápico de referência no Brasil para as leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, que estão em uso a mais de 40 anos, e já não são mais eficazes o bastante para controlar a Leishmaniose Visceral (LV) em todo mundo. O uso de medicamentos de segunda escolha, tais como Anfotericina B, Pentamidina e Miltefosina têm sido estratégicos no tratamento da LV. Neste contexto, a síntese de novos compostos por meio de bioisosterismo tem sido aplicada. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico dos compostos Alquiltriazol (Composto C11) e Alquilfosfocolínico (Composto C4) ambos análogos da Miltefosina, em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^7 amastigotas e após 60 dias de infecção foram tratados por 10 dias com 25mg/kg de C11 e C4 por gavagem e 50mg/kg de Glucantime (GLU) por via intraperitoneal. Ao fim do tratamento os animais foram eutanasiados e prosseguido da coleta de fígado e baço para carga parasitária por qPCR; análises histopatológicas e expressão de citocinas IL-10, IL-4, IL-17, TNF- α , TGF- β , INF- γ por RTqPCR no baço. Os animais tratados com C11 e C4 não apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparados com o grupo infectado e não tratado (INT) ($p > 0,05$). Mas foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre a carga parasitária do fígado dos animais tratados com C11 e GLU ($p > 0,05$). Histologicamente os animais tratados com C11 apresentaram uma maior preservação da relação de Polpa Branca (PB) e Polpa vermelha (PV), mantendo mais de 50% da polpa branca comparada a 9% do grupo INT, em relação ao saudável. A análise de expressão gênica da citocinas mostrou uma relação de resposta imunológica dos animais tratados com C11, onde observamos um aumento da expressão de IL-17 e TNF- α e redução da expressão de IL-10 comparados com INT ($p < 0,05$). Estes dados indicam que o C11 pode ser um promissor composto a ser usado no tratamento da LV, uma vez que apresentou alguns resultados positivos contra a doença no modelo experimental em hamster.

Palavras chaves: Análogos da Miltefosina. Leishmaniose Visceral. Imunopatologia, expressão de citocinas

ABSTRACT

Pentavalent antimonials are the gold standard treatment drugs of Leishmaniasis in Brazil, which are being used for over 40 years until now and no longer is able to control the Visceral Leishmaniasis (LV) in the world. The use of alternative drugs as Amphotericin B, Pentamidine and Miltefosine have been used as a new strategy against the LV. In this context, the synthesis of new compounds by bioisosterism has grown in use. The main goal of this study is to evaluate a possible therapeutic potential of Alkyltriazole (C11) and Alkylphosphocholine (C4) which are both analogs of Miltefosine, in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *L. (L.) infantum chagasi*. The animals were infected intraperitoneally with 1×10^7 amastigotes and submitted to the treatment of C11 and C4 within a concentration of 25mg/kg by gavage and 50mg/kg of intraperitoneal Glucantime (GLU). At the end of the treatment, the animals were euthanized and fragments of liver and spleen were collected to the quantification of parasitary load by qPCR; histopathological analysis and expression of IL-10, IL-4, IL-17, TNF- α , TGF- β , INF- γ cytokines by qPCR in the spleen. The animals treated with C11 and C4 did not present a statistical significant reduction of parasitary load when compared with the infected and non treated group (INT) ($p < 0,05$). Remarkably it was possible to notice that there was no significative difference between C11 and GLU groups in the liver ($p < 0.05$). Histologically the animals treated with C11 have shown a greater conservation in the White Pulp (PB) and Red Pulp (PV) ratio, keeping more than 50% of the white pulp as opposed with 9% of the INT group. The cytokines analysis showed an interesting relation of the immunologic response in the C11 group, where we note an increased expression of IL-17 and TNF- α and a decrease in expression of IL-10 faced with the INT results. This data indicates that C11 could be an interesting compound against the LV, since the promising results against the disease.

Keywords: Miltefosine Analogs. Visceral Leishmaniasis. Immunopathology, expression of cytokines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ilustração descritiva das formas amastigota e promastigota.....	15
Figura 2-	Principais formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	16
Figura 3-	Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 4-	Estado de endemia da leishmaniose visceral em todo o mundo.....	21
Figura 5-	Áreas com maior concentração de casos de LV no Brasil até 2015.	22
Figura 6-	Imunidade adaptativa de resistência e susceptibilidade na LV.....	25
Figura 7-	Estrutura química da Miltefosina.....	33
Figura 8-	Alquilfosfocolínico (Composto 4).....	34
Figura 9-	Alquiltriazol (Composto 11)	34
Figura 10-	Fluxograma do delineamento experimental.....	36
Figura 11-	Carga parasitária de fragmentos de baço e fígado de hamster infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	44
Figura 12-	Média do número de granulomas observados no fígado por área da foto.....	45
Figura 13-	Fotomicrografias de secções histológicas do fígado de hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> inoculados com <i>L.(L.) infantum chagasi</i> (cepa BH46), observação da intensidade dos infiltratos segundo os tratamentos.....	46
Figura 14-	Fotomicrografias de secções histológicas do fígado de hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> inoculados com <i>L.(L.) infantum chagasi</i> (cepa BH46), observação do numero de granulomas segundo os tratamentos.....	47
Figura 15-	Relação de porcentagem de Polpa Branca (PB) e Polpa Vermelha (PV).....	48
Figura 16-	Contagem de macrófagos infectados no baço pela área da foto.....	49
Figura 17-	Fotomicrografias de secções histológicas do baço de hamsters <i>Mesocricetus auratus</i> inoculados com <i>L.(L.) infantum chagasi</i> (cepa BH46).....	50
Figura 18-	Expressão relativa de mRNA expressos em Δ ct das citocinas proinflamatórias IL-17, IFN- γ TNF- α no baço de hamster.....	52

Figura 19-	Expressão relativa de mRNA das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4 E TGF- β no baço de hamster.....	53
Figura 20-	Perfil das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por grupo de tratamento.....	54
Tabela 1-	Sequências de primers forward, reverse, e probe referentes aos genes das citocinas avaliadas.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C4	Compoto 4 (alquilfosfocolina)
C11-	Composto 11 (alquiltriazol)
cDNA-	DNA complementar
DC	Células dendriticas
GLU-	Glucantime
HIV-	Vírus imunodeficiência humana
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
INF-α	Interferom alfa
INT-	Animais infectados e não Tratado
IS-	Índice de seletividade
LC-	Leishmaniose Cutânea
LD-	Leishmaniose Difusa
LMC-	Leishmaniose Muco-Cutânea
LV-	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral canina
mRNA-	RNA mensageiro
NINT-	Animais não infectados e não tratado
NO-	Óxido nítrico
PCR-	Reação em cadeia de polimerase
WHO-	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 MORFOLOGIA	14
2.2 TAXONOMIA.....	16
2.3 CICLO BIOLÓGICO	17
2.4 PRINCIPAL VETOR DAS LEISHMANIOSES.....	18
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.6 FORMA CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	22
2.7 ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE	23
2.8 ARSENAL TERAPÊUTICO DISPONÍVEL.....	27
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 COMPOSTOS	33
5.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E ISOLADOS DE <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ..	34
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
5.4 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	36
5.5 EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS DE BAÇO.....	37
5.6 SÍNTESE DE cDNA.....	37
5.7 ESCOLHAS DO MARCADOR MOLECULAR DA PCR EM TEMPO REAL SINGLE PARA CARGA PARASITÁRIA	38
5.8 QUANTIFICAÇÕES DA CARGA PARASITÁRIA <i>IN VIVO</i> POR PCR EM TEMPO REAL.....	39
5.9 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES PARA ANÁLISES DE EXPRESSÕES DE CITOCINAS POR RT-qPCR.....	39
5.10 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E BAÇO	42
5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
6 RESULTADOS	43
6.1 AVALIAÇÕES DA CARGA PARASITÁRIA	43

6.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPATOESPLÊNICA	44
6.2.1 Avaliação histopatológica do Fígado	44
6.2.2 Avaliação histopatológica do Baço	47
6.3 AVALIAÇÕES DA EXPRESSÃO RELATIVA DAS CITOCINAS PROINFLAMATÁRIAS TNF-A, IFN- γ , IL-17 E ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10, IL-4 E TGF-B NO BAÇO.....	51
6.3.1 Avaliação da expressão relativa das citocinas proinflamatórias TNF-α, IFN-γ, IL-17 no baço.....	51
6.3.2 Avaliação da expressão relativa das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4 e TGF-β no baço	52
7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÃO	60
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	68

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, os quais são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocitário mononuclear (BRASIL, 2006). Sua transmissão se dá durante o ato de hematofagismo da fêmea de um díptero da família Psychodidae pertencente ao gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*, de acordo com a região. Essa doença pode apresentar-se em quatro formas clínicas diferentes, de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, sendo estas: leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose mucocutânea (LMC); leishmaniose cutânea difusa (LD); leishmaniose visceral (LV) ou calazar (BRASIL, 2006).

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que 90% dos casos de LV globais foram relatados a partir de sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A LV é considerada um grande problema para a saúde pública, devido sua elevada taxa de letalidade. Inicialmente, apresentava um caráter predominantemente rural, recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Os principais indivíduos afetados são crianças menores de cinco anos, de regiões pobres com agravamento da situação imunológica associada à desnutrição (BRASIL, 2014).

O arsenal terapêutico utilizado atualmente para o tratamento e controle das leishmanioses é restrito e possui muitas limitações como, por exemplo, a alta toxicidade dos compostos, o longo esquema posológico e a contra indicação nos casos de gravidez. Um grande problema na quimioterapia antimonial é o surgimento de resistência clínica contra as drogas antimoniais pentavalentes, e assim surge a necessidade da busca por novas drogas de menor toxicidade e efeito colaterais. A miltefosina é um fármaco já usado para o tratamento do câncer, que em 2005 foi aprovado para o tratamento da LC e LV na Índia em casos onde há contra indicações ou uma não resposta aos medicamentos antimoniais pentavalentes. É a primeira droga de uso oral para o tratamento da leishmaniose, sendo usada em casos de resistência às drogas de primeira escolha. Um medicamento oral eficaz contra a leishmaniose é de extrema importância uma vez que a doença é negligenciada e prevalente em regiões pobres, a administração oral poderá aumentar a adesão ao tratamento (FERNÁNDEZ et. al., 2014). Novos compostos

análogos de miltefosina foram sintetizados com a finalidade de diminuir suas limitações associados à toxicidade gastrointestinal e ação teratogênica e superar sua ação leishmanicida. Alquilfosfocolinico (compostos C4) e Alquiltriazol (Composto C11) análogos da miltefosina apresentaram adequadas atividades leishmanicidas nos testes *in vitro* (GONTIJO, 2015). Neste sentido, a proposta deste trabalho é avaliar o potencial destes no contexto *in vivo*, avaliar seus efeitos histopatológicos e avaliar a resposta imunológica através da resposta imunológica adaptativa celular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir será descrito os aspectos gerais do parasito *Leishmania* que incluem morfologia, taxonomia, ciclo biológico, principal vetor das leishmanioses, epidemiologia, leishmaniose visceral, aspectos imunopatológicos da LV e arsenal terapêutico disponível.

2.1 MORFOLOGIA

A *Leishmania* é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. Este se apresenta de duas principais formas evolutivas durante seu ciclo de vida, a forma amastigota e a forma promastigota. A amastigota apresenta-se como uma forma arredondada que possui uma dimensão de aproximadamente 2 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura, essa variação é decorrente das diferentes espécies. Como estruturas mais evidente apresentam um núcleo relativamente grande e um cinetoplasto, o flagelo é interiorizado e reduzido. Essa forma é encontrada no interior de células fagocitárias de hospedeiros vertebrados. A promastigota apresenta-se com uma forma alongada que possui dimensões de 14 a 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm de largura. Seu corpo possui um núcleo grande, um cinetoplasto evidente e o flagelo apresentam-se exteriorizado, ilustradas abaixo na figura 1, e fotos reais podem ser observado pela imagem de microscópio óptico na figura 2. Sendo essa forma evolutiva móvel, as promastigotas se movimentam no sentido do flagelo, e possuem o cinetoplasto em posição anterior ao núcleo. Desenvolvem-se no tudo digestivo do hospedeiro invertebrado (flebotomíneos) ou em meios de culturas (SOUZA, 2013).

Ambas as formas possuem um cinetoplasto evidente, essa característica especial se dá pelo fato de conter no interior dessa organela de uma maneira extremamente organizada, uma alta concentração de DNA especial conhecida por cinetoplasto e representado pela sigla kDNA. Esse DNA do cinetoplasto pode representar cerca de 25% do DNA total da célula. Essa estrutura é basofílica podendo ser facilmente observado ao microscópio óptico com a coloração de

Giemsa. O kDNA é organizado em círculos, com dimensões diferentes. Os minicírculos, numerosos (5000 a 10000 cópias por célula) com cerca de 800 pares de base, representa 90% do kDNA. Os maxicírculos apresentam-se em menor número (25 a 50 cópias por células). O DNA dos maxicírculos é equivalente ao DNA mitocondrial de outros organismos que codificam proteínas do metabolismo. Já os minicírculos transcrevem pequenas sequências de RNA-guia que participam do controle de edição do RNA. A heterogeneidade do DNA dos minicírculos vem permitindo há anos a tipo de espécies e cepas de *Leishmania* (COURA, 2005).

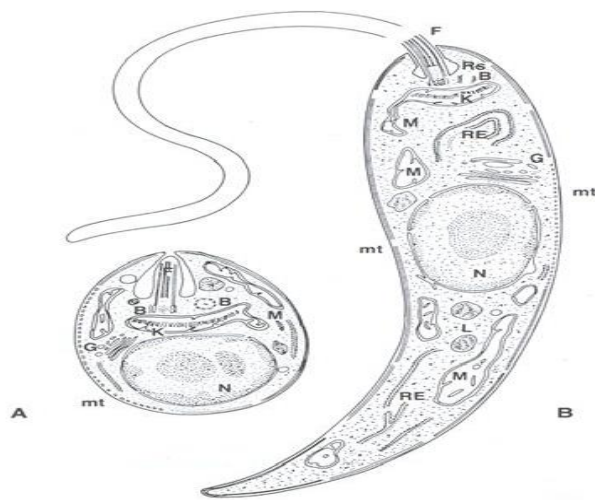


Figura 1 - Ilustração descritiva das formas amastigota e promastigota.

Fonte: COURA, 2005.

Nota: Em A, podemos observar a ilustração da forma amastigota, onde ressaltamos estruturas evidentes como: N= núcleo, k= cinetoplasto, F= flagelo interiorizado. Em B, podemos observar a ilustração da forma promastigota com as mesmas estruturas ressaltadas, com diferença no F= flagelo exteriorizado.

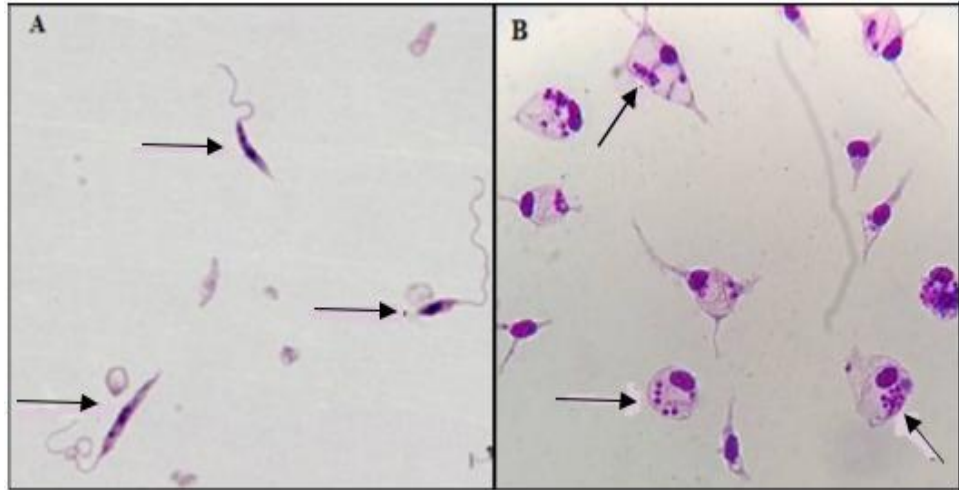


Figura 2 - Principais formas evolutivas de *Leishmania*.

Fonte: ESPURI, 2017.

Nota: Formas promastigotas em meio de cultura, objetiva de 100X (A) e formas amastigotas intracelulares, presente dentro dos macrófagos peritonias murinos e coradas com Giemsa, objetiva de 40X (B).

2.2 TAXONOMIA

Os parasitos que causam as leishmanioses pertencem ao reino Protista, sub-Reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. A taxonomia do gênero *Leishmania* apresenta muitas divergências, mas hoje é aceitável classificar este protozoário que parasitam o homem em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* de acordo com a localização da reprodução destes no inseto vetor. O subgênero *Viannia* compreende em *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, entre outros, nos quais se observa a reprodução com uma fase prolongada da divisão presa na parede posterior do intestino. O subgênero *Leishmania* compreende em *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, entre outros. Nestes últimos, observa-se que a reprodução do parasita ocorre na porção anterior e média do intestino do vetor (LAINSON, SHAW, 1998).

2.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico do parasito é dito heteroxênico, altera entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. O hospedeiro invertebrado se infecta quando a fêmea do flebotomíneo vai realizar o repasto sanguíneo, seu aparelho picador é curto e dilacera a pele formando pequenos poços de sangue e linfa na pele onde junto com o sangue ingere macrófagos infectados com amastigotas. As amastigotas são conduzidas para região anterior do trato digestório onde se aproximam formando ninhos e começa a transformação destas amastigotas em promastigotas procíclicas, que migram para o epitélio digestório e começam a se multiplicar intensamente por divisão binária até que migram do intestino para a válvula estomodeal (glândulas salivares), onde se concentram e sofre um amadurecimento chamado de metaciclogênese onde os parasitos apresentam uma redução de tamanho do corpo celular e um aumento do flagelo tornando-o móveis e altamente infectantes, sendo denominado como promastigotas metacíclicos. O acúmulo destes promastigotas metacíclicos nesta válvula impede o vetor de sugar o sangue na hora do repasto sanguíneo assim ele primeiro regurgita saliva e essas formas no tecido antes de sugar o sangue. O hospedeiro vertebrado (humanos e animais) após ser picado pelo inseto vetor (infectado) que regurgita as formas promastigotas junto com a saliva durante seu repasto sanguíneo. A saliva do inseto possui componentes com anticoagulantes e fatores atrativos para recrutar neutrófilos e macrófagos. A forma promastigota é então fagocitada por macrófagos, formando um vacúolo parasitóforo, onde o parasita dispõe de mecanismo de escape para atrasar a fusão de lisossomos ao vacúolo e ele passar da forma promastigota para a forma amastigota, sendo esta mais resistente e capaz de se multiplicar intensamente por divisão binária no interior do fagolisossomo até romper o macrófago e assim as formas amastigotas iram infectar novos macrófagos. Dependendo da espécie em questão as amastigotas seguem um tropismo de infecção dos macrófagos (REY, 2001).

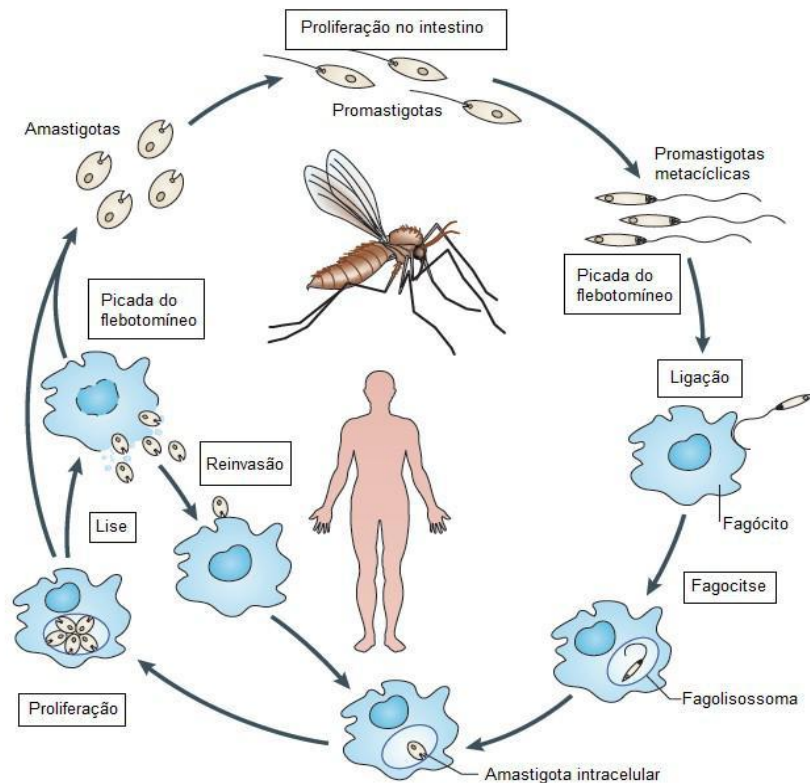


Figura 3 - Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*.

Fonte: Adaptado de KAYE; SCOOT, 2011.

2.4 PRINCIPAL VETOR DAS LEISHMANIOSES

O principal meio de transmissão da leishmaniose se dá pelo hábito de hematofagismo da fêmea (que necessita do sangue para a maturação dos ovários) da Ordem Díptera, Subordem Nematocera (antenas longas com mais de seis segmentos) Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, tendo dois gêneros de importância médica *Lutzomyia* (nas Américas) e *Phlebotomus* (no velho mundo) (Young & Ducam, 1994). Os flebotomíneos são holometábolos, ou seja, tem ciclo completo de desenvolvimento com ovos, quatro fases larvárias, pupa e adulto. Os ovos não apresentam mobilidade e sua oviposição é realizada de maneira individual ou em pequenos conjuntos em regiões de características que favoreça o desenvolvimento da larva (FORATTINI, 1973). A larva durante seus quatro estágios de desenvolvimento se diferencia na morfologia em tamanho e número de cerdas caudais, alimenta se de matéria orgânica em geral e seus estágios duram em média três semanas. Na natureza a pupa se desenvolve de 7-10 dias assim como os ovos

(KILLICK-KENDRICK, 1990). O inseto adulto possui 1-4 mm de comprimento, é piloso, cor palha ou castanho claro, seu voo é curto, baixo e saltitante não costuma se afastar dos criadouros (YOUNG, DUCAM, 1994; BRASIL, 2006).

Aproximadamente novecentas espécies de flebotomíneos são conhecidas mundialmente, os quais quinhentas espécies são encontradas na região neotropical, sendo 229 já registradas no Brasil (GALATI, 1997). Segundo Rangel e Lainsom, (2009) no Brasil quarenta espécies já foram discriminadas como suspeitas de agirem como vetores da *Leishmania*, e dezenove espécies estão relacionados com a transmissão para humanos. No Brasil, os vetores são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, dependendo da região. As principais espécies envolvidas na LTA no Brasil são *L. whitmani*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata* e *L. migonei*. E para LV duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença o *L. longipalpis* o principal e o *L. cruzi* em áreas específicas do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (RANGEL, LAISON, 2009).

Segundo Loiola (2007) entre 2001-2002 as espécies de flebotomíneos encontradas por ele em cidades do sul de Minas Gerais foram, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia intermédia*, *Nyssomyia neivai*, *Pintomyia monticola*, *Pintomyia fischeri*, *Pintomyia bianchigalatiae*, *ncontra misionensi*, *ncontra.yia brasiliensis*, *Psathyromyia aragaoi*, *Migonemyia migonei*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia sallesi*, *Evandromyia termitophila* *Psychodopygus lloydi*, *Psychodopygus davisii*, *Lutzomyia longipalpis*, *Brumptomyia brumpti*, *Brumptomyia cardosoi*, *Brumptomyia nitzulescui*, *Brumptomyia sp.* Dentre as espécies encontradas, a de maior impacto foi a *Lutzomyia longipalpis*, por ser o principal hospedeiro *L.(L) infantum chagasi* causador da LV.

O *L. longipalpis* é uma espécie que se adaptou facilmente ao peridomicílio e as variações de temperaturas, assim pode ser encontrada dentro dos domicílios e abrigos de animais domésticos, ou seja, próximo a fontes alimentos. Durante o dia, esses insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais, suas atividades são crepusculares e noturnas (BRASIL, 2017).

Segundo Colombo et al. (2011) além dos flebotomíneos atuarem como vetores, alguns ectoparasitas como carrapatos e pulgas podem estar cooperando para a disseminação da LV em cães, principalmente devido a alta frequência de

infestação e a alta prevalência de *L. (L.) infantum chagasi* viáveis encontradas nos ectoparasitas.

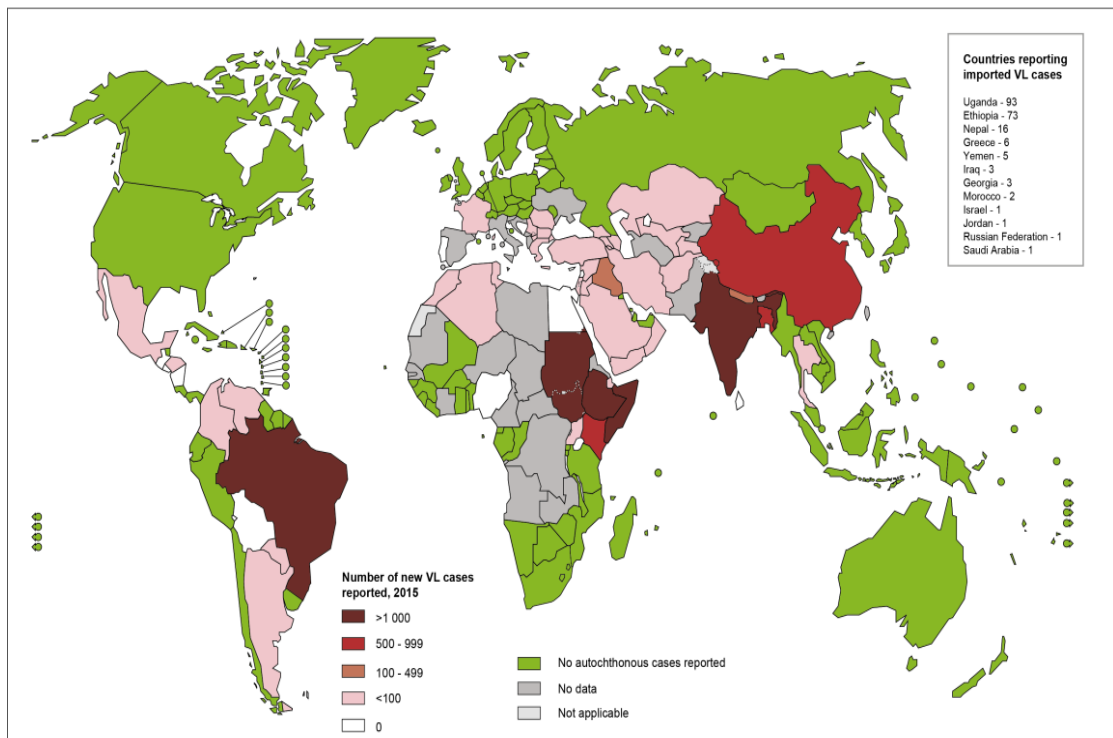
2.5 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são endêmicas em 98 países e territórios, e cerca de 616 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do sul e Sudão. Ainda de acordo com a OMS, as epidemias recorrentes de LV se concentram na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão), já as epidemias de LC têm afetado diferentes partes do Afeganistão e da República Árabe Síria. São doenças de notificação compulsória que estão entre as doenças existentes mais negligenciadas, afetando principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, associada com a desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico deficiente e falta de recursos financeiros (WHO, 2015). Em junho de 2017, a OMS relatou um surto de LV no Quênia com quatro mortos e mais de quarenta pacientes aguardando recursos médicos de diagnóstico e tratamento (WHO, 2017).

A recorrência de coinfeção de LV com portadores do HIV são preocupantes e já foi registrada em 35 países, com sua maioria na Espanha, na Itália, na França e em Portugal. Nos pacientes HIV positivos, a LV pode induzir uma maior imunossupressão e estimular a replicação viral, levando o paciente ao desenvolvimento da AIDS mais rapidamente (WHO, 2015).

A figura 4 apresenta a distribuição da leishmaniose visceral no mundo até 2015, maiores concentração de casos no Brasil, Sudão, Etiópia, Somália e Índia (WHO, 2015).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2017. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



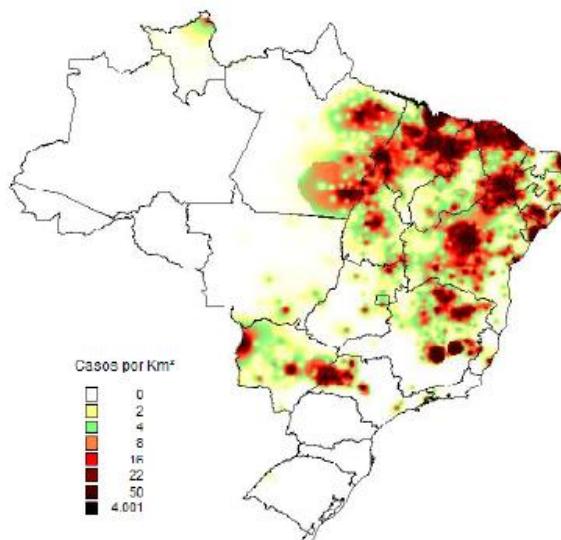
Figura 4 - Estado de endemia da leishmaniose visceral em todo o mundo.

Fonte: World Health Organization (WHO).

Nota: Estado de endemia da leishmaniose visceral em todo o mundo até 2015.

No Brasil, o ministério da saúde registrou entre os anos de 2003 a 2013 cerca de 38 mil casos de LV humana com mais de 2600 óbitos notificados. No mesmo período, foram registrados 6387 casos na região sudeste, sendo que deste, 4676 foram registrados em Minas Gerais e 461 óbitos. Na figura 5 temos a distribuição da LV no Brasil até 2015, a qual demonstra o grau de disseminação afetando quase todos os estados brasileiros, com maiores número de casos no norte do país, assim como centro Minas Gerais. A taxa de letalidade da LV vem aumentando significativamente nos últimos anos, mostrando a gravidade da doença, que vem se expandindo cada vez mais, e que ainda não possui um tratamento ou prevenção eficaz, suas vacinas estão apenas em testes e os fármacos utilizados apresentam grande toxicidade e resistência. Estes dados podem ser observados na Figura 6, onde mostra a taxa de letalidade da LV no Brasil até 2015 (MS, 2017).

Áreas com maior concentração de casos de LV, Brasil, 2015



Fonte: SVS/MS.



Figura 5 - Áreas com maior concentração de casos de LV, Brasil, 2015.

Fonte: Secretaria de vigilância em saúde.

Nota: O gráfico mostra áreas brasileiras com maior concentração de casos de LV até 2015.

2.6 FORMA CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma forma infecciosa disseminada que atinge vísceras, principalmente fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2011, 2014). A doença é caracterizada por vários sinais clínicos como febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, emagrecimento, edema e estado de debilidade, associada a alterações hemológicas e bioquímicas, tais como leucopenias, trombocitopenias, diminuição dos níveis de hemoglobina, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, além de alterações nos níveis de uréia e creatinina. Se não tratada pode levar seus pacientes a óbitos, pois evolui progressivamente, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição, edema dos membros inferiores que pode evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe,

gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos. Complicações no curso evolutivo da doença as complicações mais frequentes são de natureza infecciosa bacteriana. Dentre elas destacam-se: otite média aguda, piodermites, infecções dos tratos urinário e respiratório. Caso essas infecções não sejam tratadas com antimicrobianos, o paciente poderá desenvolver um quadro séptico com evolução fatal. As hemorragias são geralmente secundárias à trombocitopenia sendo a epistaxe e a gengivorragia as mais comumente encontradas. A hemorragia digestiva e a icterícia quando presentes indicam gravidade do caso. Dessa forma a LV é de extrema preocupação ao sistema de saúde pública (BRASIL, 2011). A leishmaniose visceral humana é causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum*. Mas pode ser ocasionalmente causada por outras espécies incluindo organismos que são normalmente associados à leishmaniose cutânea pelo fato de um trópico da pele invadir as vísceras em uma pessoa que seja imunodeprimida (GOTO, PRIANTI, 2009).

2.7 ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

A história de uma resposta protetora específica para *Leishmania* ainda deixa muitas lacunas, do que se sabe é que essa proteção depende predominantemente de mecanismos de imunidade celular com monócitos, células dendríticas (DC) e macrófagos responsáveis por capturar o parasito no sítio de infecção e apresentar a células T CD4+ *naïves* estimulando sua diferenciação e proliferação. Uma eficiente apresentação de antígenos e a produção de IL-12 por DC levam a diferenciação dos linfócitos T *naïves* em linfócitos do tipo Th1, produtores de IFN- γ . Células NK e células T CD8+ também são importantes fontes de IFN- γ . Esta citocina atua nos macrófagos ativando as enzimas óxido nítrico sintetase induzida (iNOs ou NOs2) levando a produção de óxido nítrico (NO) que leva a morte dos parasitos fagocitados. A citocina TNF é produzida por macrófagos e age com IFN- γ aumentando a ativação das iNOs (BARBIERI, 2006 e DORLO, 2004).

O melhor modelo experimental para LV vem sendo os hamster (*Mesocricetus auratus*, da linhagem goldem), por reproduzir diversas características clínicas e

laboratoriais da LV humana tais como hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (OLIVEIRA et al., 2004; GOTO et al.,2004 ; MOREIRA et al.,2012). Em hamster, a LV se manifesta semelhantes à em seres humanos, os parasitos continuam a se multiplicar no fígado, baço e medula óssea. Assim citocinas ditas leishmanicidas (pró-inflamatórias) como IL-2, IFN- γ e TNF- α são detectados neste órgão. Mesmo com a produção destas citocinas, a infecção ainda progride, acredita-se que isso ocorra devido mecanismos de supressão que agem em macrófagos e que permite a *Leishmania* se multiplicar. Uma resposta com elevada produção de citocinas do padrão Th2, como IL-4,IL-5, IL-10 IL-13 além de uma ativação policlonal de células B resultando em hiperpoliglobulinemia (GUO et al.,2002; SAHA et al.,2011). Dentre as citocinas relacionadas à susceptibilidade a IL-10 foi identificada em diversas amostras na LV humana através de análise de expressão de mRNA na medula óssea, nódulos linfáticos e baço além de detecção de níveis elevados no soro (GAUTAM et al. 2011). Em modelos experimentais como BalB/c foi possível avaliar a IL-10 como biomarcador de susceptibilidade com perfil anti-inflamatório e imunomodulador com papel central na imunopatologia e persistência do parasito durante a evolução natural da LV. Ela age suprimindo a função de células NK, inibe a apresentação de antígenos a células T, e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-12 (KANE et al., 2001; GOTO et al., 2004).

O Fator de Crescimento Tumoral (TGF- β) também é uma citocina importante para a susceptibilidade a LV. Estudos com murinos mostraram que TGF- β inibe a produção de NO por macrófagos, tendo assim um importante papel na modulação da resposta imune. Altos níveis já foram detectados no soro e quantificados por expressão de mRNA na medula óssea e baço (RODRIGUES et al., 2009).

As células T reguladoras (T regs) são uma importante fonte de citocinas supressoras. Agem suprimindo células do sistema imune inato e adquirido através da indução de secreção de citocinas como IL-10, TGF- β e também agem através de contato celular. Estudos mostraram que em camundongos já curados de LC causados por parasitos da espécie *L. major*, quando se faz a transferência de células T regs elas são capazes de reativar a doença suprimindo a resposta imune protetora local e dando ao parasito capacidade de se multiplicar novamente (MENDEZ et al., 2014). Já na LV as células T regs não são bem compreendidas o que se sabe é que sendo uma das principais fontes de IL-10 e esta citocina é a

principal envolvida em casos de susceptibilidade acredita estar envolvida na patogênese da LV (NYLEM et al., 2007). Baneth et al (2008) mostrou em seus estudos uma visão sobre a interação entre as respostas Th1 e Th2 ambas presentes na leishmaniose visceral canina, quando a resposta tende a Th2 os cães apresentavam a doença clínica com manifestações clínicas aparentes, já quando o equilíbrio tende a Th1 os cães se apresentavam assintomáticos, ou com poucos sinais clínicos, assim demonstra na figura 6 como a imunidade adaptativa direciona a resposta imune frente ao parasito, para a eliminação do parasito ou para sua disseminação.

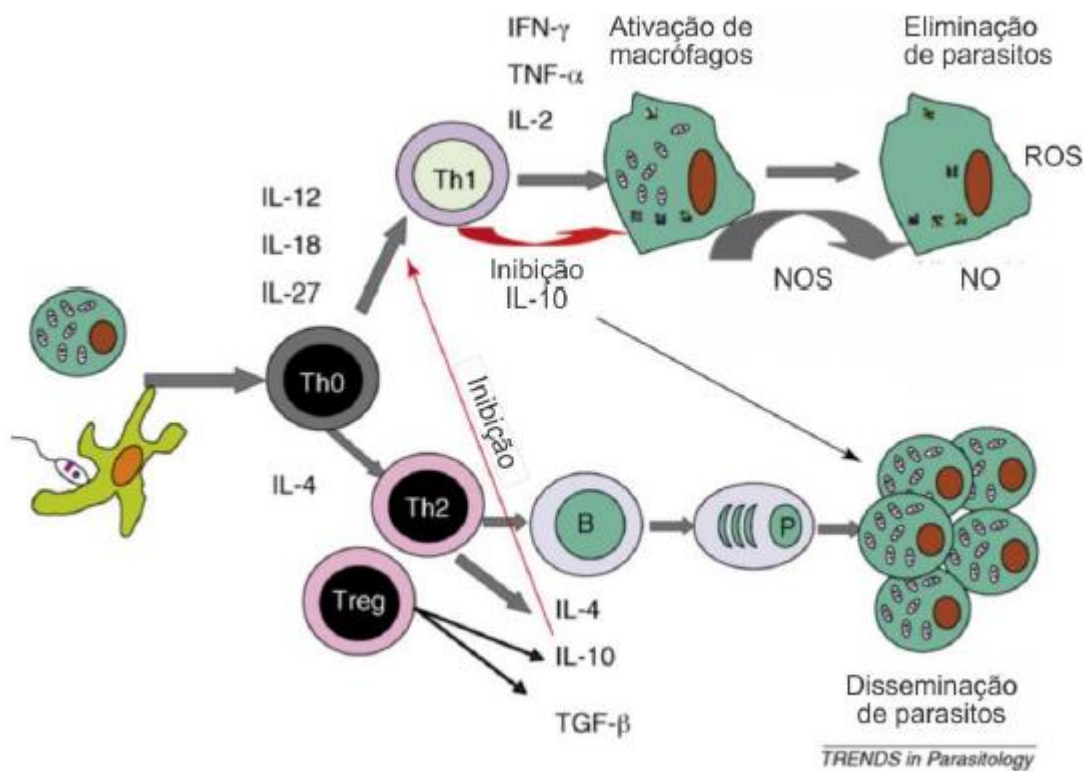


Figura 6 - Imunidade adaptativa de resistência e susceptibilidade na LV.

Fonte: BANETH et al., 2008.

Nota: As citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α induzem a ativação de macrófagos e a morte de parasitas por NO na resposta Th1. Por outro lado, IL-10, TGF- β e IL-4 estão envolvidos na disseminação do parasita associada ao aumento da atividade das células B (B), plasmáticas (P) e hiperglobulinemia relacionadas à resposta Th2. As respostas Th1 são reguladas negativamente pela IL-10 produzida pelas células T reguladoras (Treg). A IL-10 também é produzida por células da linhagem Th1 e é proposta para ser benéfica na limitação da imunopatologia secundária desencadeada pela infecção, mas também previne a imunidade estéril e permite a persistência de infecção de baixo nível.

As células Th17 tem como característica principal a produção de citocinas IL-17A e F, mas também é fonte de TNF, IL-21 e IL22. Para a indução das células Th17 é necessário um ambiente rico em IL-1 β , IL-6 e TGF- β e IL-23 para a maturação desta. A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina inflamatória que desempenha um papel protetor contra parasitas intracelulares. O papel de IL-17 durante uma infecção por *Leishmania* permanece com controversas e mal definidos. Níveis elevados de IL-17 em uma infecção *Leishmania braziliensis* com manifestações clínicas mucosas e cutâneas, sugerem que a IL-17 pode ser patológica, porém na leishmaniose visceral a presença de IL-17 tem sido correlacionado com a resistência à doença (GHOSH et al. 2013). Segundo Nascimento et al., 2015 a IL-17 está presente na resposta imune de pacientes com LV e seus níveis diminuem com o tratamento bem sucedido da doença. Em modelos murinos com uma infecção por *L. infantum chagasi* a maior produção de IL-17 coincidem com o pico de parasitismo. Estudos com animais nocaute para IL-17 mostraram uma maior suscetibilidade à infecção e também tiveram uma redução no infiltrado inflamatório e expressão IFN- γ , comparados com animais selvagens. Também foi demonstrado que a IL-17 atua sinergicamente com IFN- γ potencializando a produção de óxido nítrico e a atividade leishmanicida em macrófagos infectados. Já em modelos experimentais murinos com LC causada por *Leishmania major*, a produção de IL-17 foi associado com a progressão da doença, uma vez que os animais deficientes em IL-17 apresentaram lesões menores que os animais controle (NOVOA et al., 2012).

A IL-17 tem ação de potencializar doenças inflamatórias e autoimunes, tais como artrite reumatoide e esclerose múltipla. Seus efeitos pró-inflamatórios ocorrem com a indução da produção de NO (KOLLS, LINDEN, 2004). A ação destes mediadores sugere um importante papel da IL-17 nas infecções por parasitas intracelulares, como já foi demonstrado durante uma infecção por *Trypanosoma cruzi* (DA MATTA GUEDES et al., 2010).

Dentre as alterações histopatológicas da LV ativa uma característica dominante no baço é hiperplasia e hipertrofia de macrófagos na polpa vermelha onde proliferam os parasitos. A presença das citocinas IL-10 e TGF- β neste local pode desencadear a progressão da infecção. Outros estudos mostraram que altos níveis de TNF- α na zona marginal leva uma desorganização de polpa branca o que também contribui para progressão da infecção. No entanto, estudos recentes

sugerem que além das variações imunológicas dos hospedeiros fatores dos parasitas são de extrema importância para continuidade da infecção. Um exemplo é catepsina B que ativa TGF- β diretamente e a arginase do parasito que ativa um fator não específico do hospedeiro que inibe a produção de NO (GOTO, PRIANTI, 2009).

2.8 ARSENAL TERAPÊUTICO DISPONÍVEL

O arsenal terapêutico utilizado atualmente para o tratamento e controle das leishmanioses é restrito e possui muitas limitações como, por exemplo, a alta toxicidade dos compostos, o longo esquema posológico e a contra indicação nos casos de gravidez. Além disso, os compostos antimoniais descritos há quase 100 anos para o tratamento das leishmanioses, inclusive da forma visceral, permanecem sendo usado como fármacos de primeira escolha em grande parte do mundo. O tratamento usado antigamente era a base de antimoniais trivalentes, que foi posteriormente substituído pelos pentavalentes, devido sua menor toxicidade. Os derivados de antimoniais pentavalentes são usados desde a década de 40 no tratamento das leishmanioses, porém possuem baixa absorção oral, sendo administrados por via intramuscular ou intravenosa. Possuem alta toxicidade o que leva a persistência dos efeitos colaterais e como agravante possui o tratamento de grande duração, sendo estas as principais dificuldades para tratar os pacientes portadores de leishmaniose (MOORE, LOCKWOOD, 2010).

Segundo Ministério da Saúde (2010), a relação de medicamentos essenciais para as leishmanioses são os antimoniatos de meglumina comercialmente chamado de glucantime; anfotericina B e isetionato de pentamidona. O Glucantime é de uso intravenoso ou intramuscular, recomendado para adultos e crianças é o fármaco de primeira escolha no Brasil, indicado ao tratamento de LC, LMC e LV. Sua eficácia clínica depende da dose, esta pode ser ajustável e da duração do tratamento que varia de 20 a 28 dias. O mecanismo de ação destes compostos é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação em amastigotas, mas sendo um metal pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como com a do hospedeiro. Também foi observado que são capazes de inibir a topoisomerase II de *L. panamensis* e de *L. donovani*. Sobre sua farmacocinética

sabe-se que cerca de 80% da dose administrada do fármaco é excretada na urina em 24 horas na sua forma inalterada. Sua contraindicação se aplica a pacientes com insuficiência renal, cardíaca e hepática. Por falta de estudos de teratogenicidade não se deve administrar o fármaco em grávidas, estas tem que ser encaminhadas para grandes centros para uma avaliação de riscos e benefícios. Sabe-se da baixa resposta ao Glucantime em pacientes imunocomprometidos, com LV, incluindo pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (BRASIL, 2015). Um grande problema na quimioterapia antimonial é o surgimento de resistência clínica contra as drogas antimoniais pentavalentes, e assim surge a necessidade da busca por novas drogas de menor toxicidade e efeito colaterias (DA LUZ et al. 2015). Alguns autores têm descrito cepas de *Leishmania* resistentes ao Glucantime com uma velocidade preocupante de recorrência. Há regiões como Sudão, Itália, Índia entre outros que nem se usa mais o Glucantime como opção de terapia. Como exemplo temos segundo recomendação da OMS o regime de tratamento recomendado para LV causada por *L. donovani* classificados por preferência em Bangladesh, Butão, Índia e Nepal que tem como medicamento de primeira escolha a Anfotericina B lipossomal, associado ou não a miltefosina, e paromomicina (LEPROHON et al. 2015).

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico que possui atividades antifúngicas dependendo da concentração obtida nos fluidos corporais e da sensibilidade dos fungos. Seu mecanismo de ação atua por ligação aos esteróis da membrana celular do fungo sensível, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares. A *Leishmania* e os fungos possuem ergosterol como principal esteroide nas membranas plasmáticas, logo, a AmB liga-se ao ergosterol, causando alteração da permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito. As membranas dos animais superiores também contêm esteróis e isto sugere que o dano às células humanas e fúngicas podem ter mecanismos comuns. A AmB pode ser usada para leishmaniose como esquema terapêuticos alternativo em falha da utilização da droga de primeira escolha, mas seu uso é restrito devido aos efeitos colaterais. A necessidade de internação, a longa duração do tratamento, a toxicidade são algumas das desvantagens no uso da anfotericina B, além de sua contraindicação em pacientes com insuficiência renal por ser nefrotóxico (FREITAS-JUNIOR, 2012).

A pentamidina é um antiprotozoário indicado em certos casos de pneumocistose, tripanossomose africana e leishmaniose visceral em áreas com os parasitas resistentes aos antimoniais, como no norte da África. Tem sido utilizada como segunda linha nos casos não responsivos aos antimoniais, mas também apresenta efeitos adversos graves principalmente em pacientes com disfunção hepática, renal, hipertensão ou hipotensão, hiperglicemia ou hipoglicemia, leucopenia, trombocitopenia ou anemia. A pressão arterial deve ser cuidadosamente controlada durante a administração e entre intervalos regulares até à conclusão do tratamento. Seu mecanismo de ação não está claramente definido, o fármaco pode interferir com a incorporação de nucleotídeos e de ácidos nucléicos do RNA e DNA ao impedir a fosforilação oxidativa, o que ocasiona a inibição da biossíntese do DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas; e também pode interferir com a transformação de folato. (ALVAR et al., 2006).

A Miltefosina é uma alquifofocolina um grupo de composto que possui atividades biológicas já descritas como antineoplásicas, antibacterianas, antimicótica, antiprotozoária e antivirótica (GONTIJO, 2015). Esta é usada como fármaco no tratamento do câncer e, em 2005, foi aprovada para o tratamento da leishmaniose cutânea em casos onde há contraindicações ou uma irresponsividade medicamentos antimoniais pentavalentes (FERNÁNDEZ et al., 2014). Mas desde 2002 o fármaco tem registro na Índia e vem sendo utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral refratário ao tratamento convencional com antimoniais e seus resultados são promissores. Em 2005, a miltefosina foi registrada também na Colômbia e Bolívia. É a primeira droga de uso oral para o tratamento da leishmaniose, um medicamento oral eficaz contra a leishmaniose é de extrema importância uma vez que gera muitos benefícios como a diminuição da hospitalização em casos de LV, gerando economia para o estado; redução do desconforto pelas injeções, melhorando a qualidade de vida do paciente. Sendo a leishmaniose uma doença negligenciada e prevalente em regiões pobres, a administração oral poderá aumentar a adesão ao tratamento (CASTELO BRANCO. et al. 2016). O mecanismo de ação da miltefosina ainda não é bem definido, mas diversas hipóteses mostram ações diretas do fármaco sobre o parasito, como alterações da composição da membrana interferem no metabolismo de lipídios, na biossíntese de glicoproteínas, disfunção mitocondrial além de poder acarretar a morte da *Leishmania* por apoptose celular (DORLO et al., 2012). A miltefosina é

comercializada para o tratamento de leishmaniose visceral canina em países como a Espanha, Portugal e recentemente foi liberada sua comercialização no Brasil (“Milteforan” Virbac) (MAPA/MS, 2016).

Os fármacos apresentam uma série de problemas, que incluem resistência do parasito e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia. Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas.

O bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular de um composto baseada na troca de determinados fragmentos moleculares, visando melhorias para os novos análogos. Podem ser moduladas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, ou farmacodinâmica de ação de um composto bioativo. A motivação de seu uso pode estar relacionada ainda, à melhoria diminuição de toxicidade, visando transformá-lo em um candidato a composto-protótipo mais promissor e atraente em termos terapêuticos (BARREIRO, FRAGA, 2005). Com o objetivo de desenvolver novos fármacos eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados. Assim, compostos análogos da miltefosina foram sintetizados e testados quanto suas atividades leishmanicidas e citotóxicas *in vitro*, dos diversos análogos testados os nomeados como C4 e C11 foram os que apresentaram melhores resultados de IC₅₀, CC₅₀ e IS (GONTIJO et al., 2015). Portanto, devido aos bons resultados *in vitro* os compostos C4 e C11 foram avaliados quanto suas atividades leishmanicidas *in vivo*, no presente trabalho.

3 JUSTIFICATIVA

Os protozoários patogênicos continuam a despertar o interesse da área médica pelo fato de serem agentes etiológicos de doenças de grande prevalência em países em desenvolvimento, sendo essas a maioria doenças negligenciadas por afetarem uma classe mais pobre da população. Como exemplo, a leishmaniose é endêmica em 98 países com cerca de 350 milhões de pessoas em área de risco de contaminação e 12 milhões de pessoas infectadas (BRASIL, 2004). A leishmaniose é de alta incidência no Brasil, e tem se tornado preocupante em casos de associação de AIDS-leishmaniose, devido ao comprometimento do sistema imunológico (WHO, 2015).

A miltefosina foi licenciada como o primeiro fármaco de uso oral aprovado para tratamento das leishmanioses, o que foi um grande avanço para gestão desta doença tão negligenciada, uma vez que o prolongado esquema terapêutico e a necessidade de âmbito hospitalar para administração dos fármacos utilizados levam à população, na maioria das vezes carente, a desistência do tratamento (CASTELO-BRANCO, 2016). Assim, um medicamento de uso oral eficaz é de extrema importância para o tratamento das leishmanioses.

A leishmaniose continua a desafiar o conhecimento científico já que o arsenal terapêutico que dispomos para combatê-la ainda é pobre e a possibilidade de preveni-las com a utilização de vacinas ainda é pouco provável. Assim, a busca por novos fármacos se faz tão necessária. Visto que os compostos em questão apresentaram boas atividades leishmanicidas *in vitro*, o presente estudo tem como proposta investigar seu potencial *in vivo*, esperando assim, contribuir para o avanço no tratamento quimioterápico.

4 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos gerais e específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade leishmanicida dos compostos alquilfosfocolínico (Composto 4) e alquiltriazol (Composto 11) análogos de miltefosina *in vivo*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito terapêutico de compostos C4 e C11 análogos a miltefosina, através da carga parasitária hepática e esplênica;
- Determinar as alterações histopatológicas hepáticas e esplênicas após o tratamento com os compostos C4 e C11.
- Determinar a expressão relativa de mRNA das citocinas pro-inflamatórias IL-17, TNF- α e IFN- γ esplênica após o tratamento com os compostos C4 e C11.
- Determinar a expressão relativa de mRNA das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TNF- α esplênica após o tratamento com os compostos C4 e C11.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos; e contou com apoio dos laboratórios do Departamento de Patologia e Parasitologia da Universidade Federal de Alfenas.

5.1 COMPOSTOS

Os análogos de Miltefosina (Figura 7) trabalhados neste contexto foram os compostos Alquilfosfocolínico (Compostos 4) representado na figura 8 e o composto Alquiltriazol (Composto 11) representado na figura 9, os quais foram sintetizado no LABSINTO- Laboratório de Síntese Orgânica da UFMG e gentilmente cedidos pela pós-doutoranda Vanessa Silva Gontijo, para a realização dos ensaios.

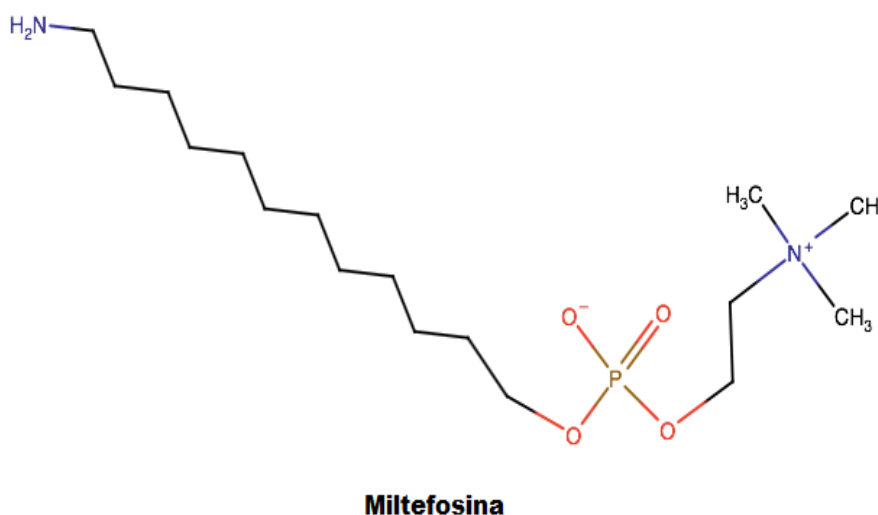


Figura 7- Estrutura da Miltefosina.

Fonte: (GONTIJO, 2015)

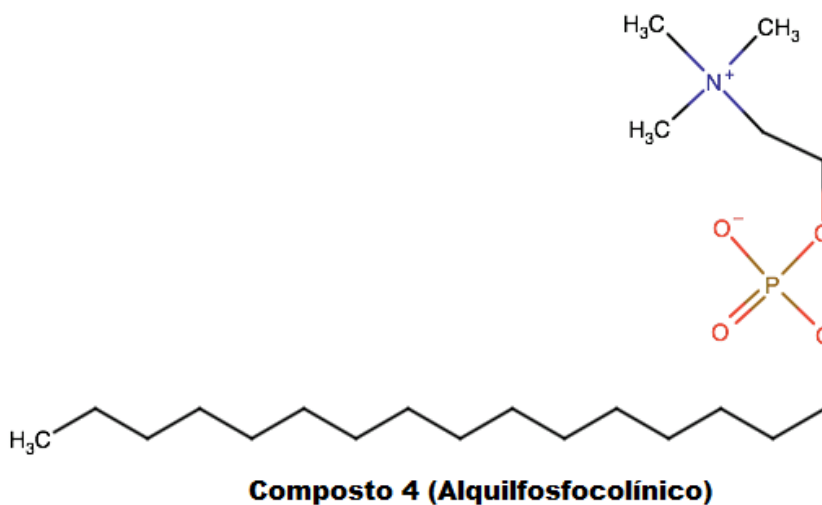


Figura 8- Estrutura do Composto 4 (Alquilfosfocolínico).
 Fonte: (GONTIJO, 2015).

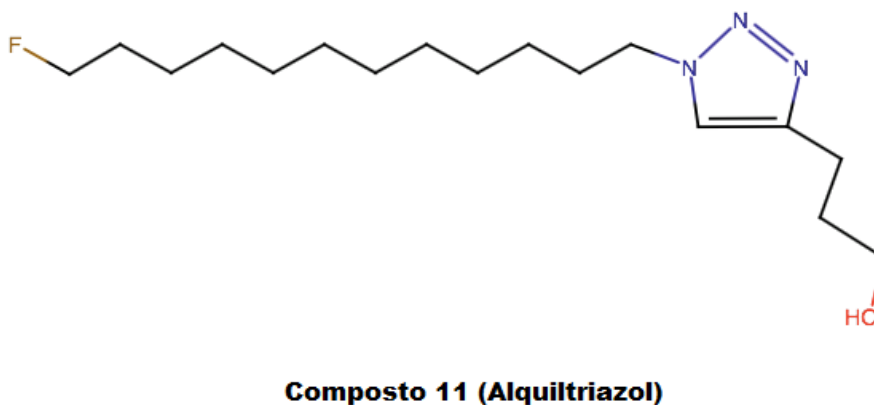


Figura 9- Estrutura do Composto 11 (alquiltriazol).
 Fonte: (GONTIJO, 2015)

5.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E ISOLADOS DE *L. (L.) infantum chagasi*

Para realização deste estudo, foram utilizados 30 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), desmamados os quais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento uma ração comercial *ad libitum*. Para a infecção experimental, foi utilizada a cepa de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46). Os animais foram infectados por via

intraperitoneal com 1×10^7 amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) provenientes de um baço de outro animal infectado. As amastigotas para a infecção foram obtidas por meio de centrifugação diferencial do baço de hamsters previamente infectados e o número de parasitos foi determinado pelo método de Stauber (1958). A infecção foi mantida por 60 dias até o começo do tratamento. O protocolo experimental com estes hamsters foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, com o número de protocolo 21/2017.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 30 hamster dourados (*Mesocricetus auratus*), divididos em 5 grupos com 6 animais um total de 30 animais. Destes 4 grupos foram infectados com 1×10^7 amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, um grupo foi mantido sem tratamento denominado grupo INT (infectado e não tratado). Após 60 dias de infecção começaram os tratamentos que duraram 10 dias. Os outros 3 grupos receberam os seguintes tratamentos, 1 grupo foi tratado com Glucantime 50 mg/kg/dia por via intraperitoneal, 1 grupo recebeu o composto 11 25mg/kg/dia por gavagem ficou denominado como C11 (grupo tratado com o composto 11) o outro grupo recebeu o composto C4 25mg/kg/dia por gavagem ficou denominado C4 (grupo tratado com o composto 4). Um grupo foi mantido sem infecção e sem tratamento como controle. Após os 10 dias de tratamento os animais sofreram eutanásia por câmara de CO₂ e foram retirados fragmentos do fígado e baço para a avaliação da carga parasitária e para análise da expressão relativa de RNAm das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e no baço. Foram utilizados mais um fragmento para a realização das laminais histológicas.

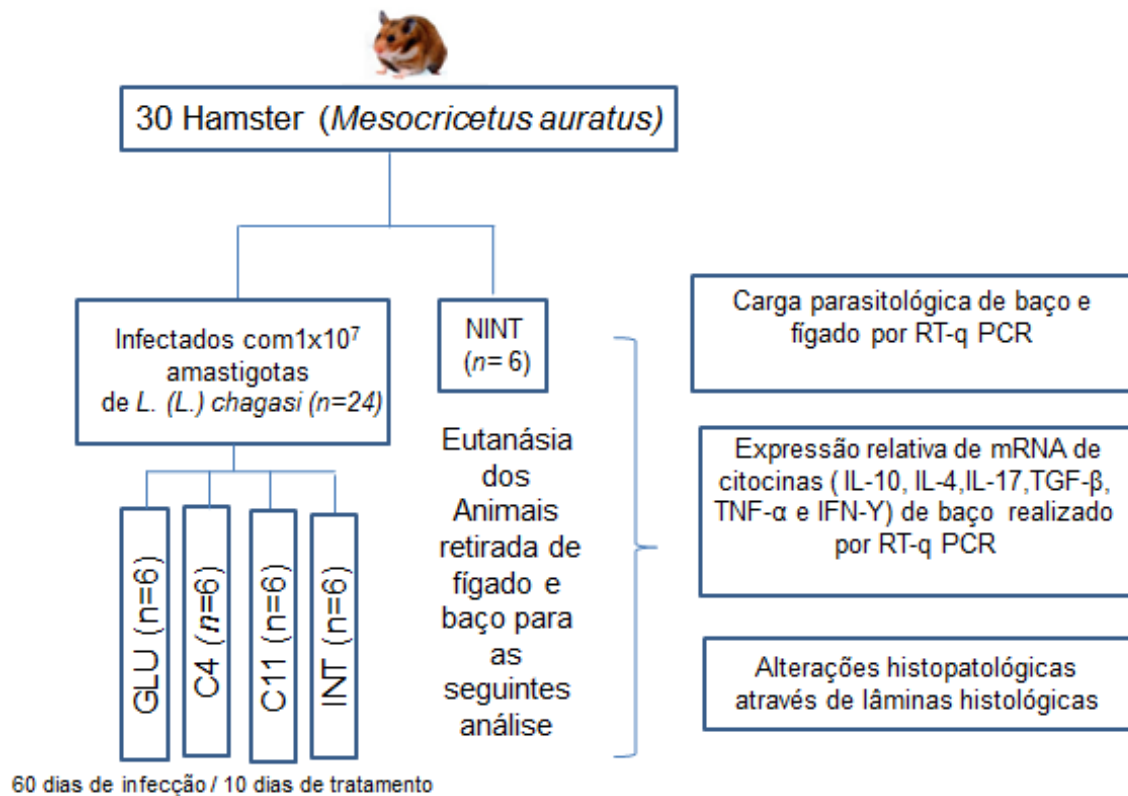


Figura 10 - Fluxograma experimental.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, os hamsters foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio de tesoura cirúrgica estéril. O fígado e baço foram removidos de forma asséptica e pesados imediatamente. Estes foram subdivididos em fragmentos, onde um pequeno fragmento foi destinado a qRT-PCR, o qual foi pesado e imediatamente congelado. O restante do órgão foi preservado em formol tamponado a 10% pH 7,2 durante 24 horas e depois colocado em álcool 70% até o preparo das lâminas para a avaliação histopatológica.

5.5 EXTRAÇÃO DE RNA DAS AMOSTRAS DE BAÇO

Na etapa de extração do RNA total, foram utilizadas quantidades de tecidos com o peso de aproximadamente 20mg. Os tubos contendo os fragmentos de baço ou fígado ainda congelado foram macerados e adicionados uma Solução de Lysis 600 μ L + 1% Mercaptoetanol (6 μ L) e deixados no agitador por aproximadamente 10 minutos, até que líquido este fique transparente. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadantes foram transferidos para um tubo “eppendorf” próprio do kit chamado Receiver Tube (sem tampa) de 2,0mL com 330 μ L de etanol 96%. Fez-se a homogeneização e transferiu todo conteúdo para um novo Receiver Tube (com tampa e com coluna), centrifugou-se por 1 minuto a 10.000rpm. Foi desprezado o que passou e recolocou-se a coluna, adicionando 500 μ L wash Buffer 1 para centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm. Transferiu-se a coluna para um novo tubo RTA Receiver Tube e foi adicionado 500 μ L de wash Buffer 2 para uma nova centrifugação de 1 minuto a 10.000rpm. Foi desprezado o líquido que passou e recolocou a coluna, centrifugou-se por 3 minutos a 10.000rpm. Logo após, a coluna foi transferida para novo tubo o RNase-free Elution Tube e adicionou-se 50 μ L de Elution Buffer R, centrifugou-se por 1 minuto a 10.000rpm. Assim, a coluna foi desprezada e o RNA congelado o mais rápido possível. Todas as Soluções e Tubos estão presentes no kit, junto com o protocolo conforme descrito.

5.6 SÍNTESE DE cDNA

As amostras de RNA foram dosadas pelo nanodrop e padronizadas em utilizar 500ng pelo para a síntese de cDNA. A uma quantidade de 11,0 μ l do RNA foi adicionado 1,0 μ L de uma mistura contendo os quatro “DNTP’s” e 1,0 μ l de primers. A seguir, as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C. Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos. Ao final deste tempo foi adicionado as misturas, 2 μ l DTT e o 4 μ l tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3 ; KCl, 375mM; MgCl₂ 15mM) e colocado

novamente no termociclador por 20 segundos a 37°C. Após os 20 segundos, foi adicionado 1,0 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), que é a responsável para a complementação do RNA para cDNA que é de fita dupla. O grau de pureza das amostras é analisado no Nanodrop ND2000 pela medida da absorbância 260/280 nm (SAMBROOK et al., 1989). Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR, as amostras foram congeladas a -20 °C e utilizadas na PCR quantitativo em tempo real.

5.7 ESCOLHAS DO MARCADOR MOLECULAR DA PCR EM TEMPO REAL SINGLE PARA CARGA PARASITÁRIA

Para a PCR em tempo real foram utilizados sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3'-end, foi ligado um “quencher” NFQ (non-fluorescent quencher). O desenho das sequências foi: LINJ31F: 5'CCG CGT GCC TGT CG3'; LINJ31R 5'CCC ACA CAA GCG GGA ACT3' e a sonda TaqMan 5'CCTCCTTGGACTTTGC3'. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 10 µL por reação. O volume de 1,0 µL de DNA ou cDNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 5,0 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e 0,50 µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18 µM, e a sonda TaqMan, marcada com FAM e usando NFQ como quencher na concentração de 5 µM. Foram adicionados às reações dois controles negativos e um controle positivo, assim como realizados na PCR convencional. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50 °C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa foi de um ciclo a 95 °C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por 1 minuto. Este marcador já foi utilizado com sucesso na quantificação de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* retiradas do interior de carrapatos e pulgas (COLOMBO et al., 2011).

5.8 QUANTIFICAÇÕES DA CARGA PARASITÁRIA *IN VIVO* POR PCR EM TEMPO REAL

Para a avaliação do tratamento foi utilizada a curva padrão para determinar o número absoluto de parasitos presentes por mg de amostra. O número do Ct (valor do correspondente ao ciclo em que a quantidade de cópias de DNA alvo ultrapassa um limite determinado pelo aparelho) obtido pela PCR em tempo real foi plotado na curva padrão para a obtenção do número de parasitos. O sinal foi gerado pelo acúmulo de sinal fluorescente correspondente ao acúmulo de DNA amplificado.

5.9 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES PARA ANALISES DE EXPRESSÕES DE CITOCINAS POR RT-qPCR

Os primers foram desenhados utilizando o Software Primer Blast. As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados neste estudo foram obtidos do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os primers que foram utilizados são sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Produzidos pela INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) e suas sequências estão demonstradas a seguir na tabela 1.

O ensaio para avaliar a expressão gênica das citocinas IL-10, IL-4, IL-17a, TNF- α , TGF- β , IFN- γ nas amostras de baço, foram realizados utilizando os iniciadores (primers) na concentração de 0,5 p/mol, de sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas e cDNA diluído 5x em água livre de nucleases, perfazendo um volume final de 10 μ L de reação. Os resultados foram expressos pelo método Δ Ct que consiste de uma quantificação relativa. Sendo assim, neste tipo de análise foi realizada uma normalização de expressão deste alvo para cada amplificação, ou seja, sua expressão é subtraída pela expressão de um gene constitutivo que é expresso de maneira semelhante em diferentes tecidos e em diferentes condições. Assim, para cada amostra alvo foram amplificados os genes das citocinas (IL-10, IL-4, IL-17, TGF- β , TNF- α E IFN- γ) e o gene constitutivo (MG), de forma a se obter os valores dos Threshold Cycles (Ct) correspondentes e a

realização dos cálculos para obtenção dos resultados. Para se realizar uma análise com base nos valores do Ct faz-se necessário que as eficiências entre alvos (citocinas) e o gene endógeno sejam semelhantes. Assim, os cálculos para a determinação do ΔCt foram realizados pelo valor do Ct do gene das citocinas – Ct do gene constitutivo.

Tabela 1: Sequências de *primers forward*, *reverse*, e *probe* referentes aos genes avaliados e função.

IL-10

Primer 1: CCA GCT GGA CAA CAT ACT ACT C

Primer 2: CTG GAT CAT TTC TGA TAA GGT TTG G

Probe: /56-FAM/TG CAG GAC T/Zen/T TAA GGG TTA CTT GGG T/3IABkFQ/

IL-4

Primer 1: GAA GAA CTC CAC GGA GAA AGAC

Primer 2: GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT A

Probe:/56-FAM/CT TCC CAG G/Zen/T GCT TCG CAA GTT T/3IABkFQ

TGF- β

Primer 1: GGC AGC TGT ACA TCG ACT TT

Primer 2: GAC AGA AGT TGG CGT GGT AG

Probe: /56-FAM/TG GAA GTG G/Zen/A TTC ACG AGC CCA AG/3IABkFQ/

IFN- γ

Primer 1: GAG GAG CAT AGA CAC CAT CAA G

Primer 2: CCT GAA GGT CAT TTA CCG GAA T

Probe: /56-FAM/TC TTC AAC A/Zen/G CAG CAT GGA GAA ACT CA/3IABkFQ/

IL-17

Primer 1: CTC CAG CAG CAA CTC TTC TT

Primer 2: TCT TCT GTT GCT GGT CTC TTG

Probe: /56-FAM/CC AGC CAG G/Zen/G TTC TTC TCA AGC TC/3IABkFQ/

TNF- α

Primer 1: GGT TTA CTC CCA GGT TCT CTT C

Primer 2: GGA CAG GAG GTT GAC GTT AT

Probe: /56-FAM/TC AGC CGC A/Zen/T TGC TGT GTC CTA /3IABkFQ/

MG (Microglobulina, gene constitutivo de hamster)

Primer 1: GGT CTT TCT ATC TCT TGG CTC A

Primer 2: CTT GGG CTC CTT CAG AGT TAT G

Probe: /HEX/ACT GCG ACT/ Zen/ G ATA AAT ACG CCT GCA/3IABkFQ/

Fonte: Elaborado pela autora.

5.10 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E BAÇO

Fragmentos de fígado e baço de hamsters fixados em formol 10% tamponado pH 7,2 foram processados e embebidos em parafina. Sobre lâminas de vidro, previamente desengorduradas com solução álcool-éter, foram colocados cortes histológicos com espessura de 5 μm . As lâminas obtidas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina para análise das alterações histopatológicas. A análise histopatológica foi realizada em lâminas histológicas, fotografadas pelo microscópio óptico acoplado a câmera e programa da Axion Vizion (software solution from Carl Zeiss) nas objetivas de 10X e 40X em um número de 20 fotos por lâmina o qual estão informações representativas do estado dos órgãos analisados. A análise foi realizada pelo programa Imagem Pro-Plus. O processo inflamatório no fígado foi quantificado em 20 imagens aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). A escolha pela análise em 20 imagens foi devido a um estudo piloto no laboratório, onde foi demonstrado que esse número de campos era suficiente para a obtenção de uma leitura representativa da lâmina inteira. As alterações histopatológicas do baço e fígado avaliadas foram qualitativas e realizadas levando-se em consideração a extensão das alterações observadas em todo o corte histológico. As alterações histopatológicas avaliadas foram: no baço - depleção de polpa branca (PB), hiperplasia de polpa vermelha (PV), com uma relação de porcentagem PB X PV; no fígado - presença de granulomas e inflamação periportal que foi classificado quanto sua intensidade (pequena, moderada e intenso).

5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas o GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Depois de demonstrado uma não normalidade dos dados usando o teste *Shapiro-Wilk*, foi realizada análise de variância por *kruskal-Wallis* seguida do teste *Mann-Whitney* dois a dois para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Em todas as análises estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0.05.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estarão descritos da seguinte forma: Avaliação da carga parasitária, avaliação da expressão relativa das citocinas no baço e análises histopatológicas hepáticas e esplênicas.

6.1 AVALIAÇÕES DA CARGA PARASITÁRIA

Os resultados obtidos pela qPCR em tempo real foram descritos em amastigotas por grama de órgão a partir do cálculo do número de amastigota encontrado no tecido multiplicado pelo peso do fragmento usado para análise (COLOMBO et al., 2017). Após a análise os dados obtidos do baço e fígado estão demonstrados na figura 11. Os animais dos grupos C11 e C4 não apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparado com o grupo INT em ambos os órgãos, baço e fígado ($p < 0.05$). Mas foi possível observar que não houve diferença significativa entre a carga parasitária do fígado dos animais do grupo C11 comparados com o fígado dos animais do grupo GLU ($p > 0.05$), este que mostrou uma redução significativa na carga parasitária em ambos os órgãos baço (4.518×10^4) e fígado (7.328×10^4) comparados com INT baço (2.02×10^6) e fígado (4.03×10^6).

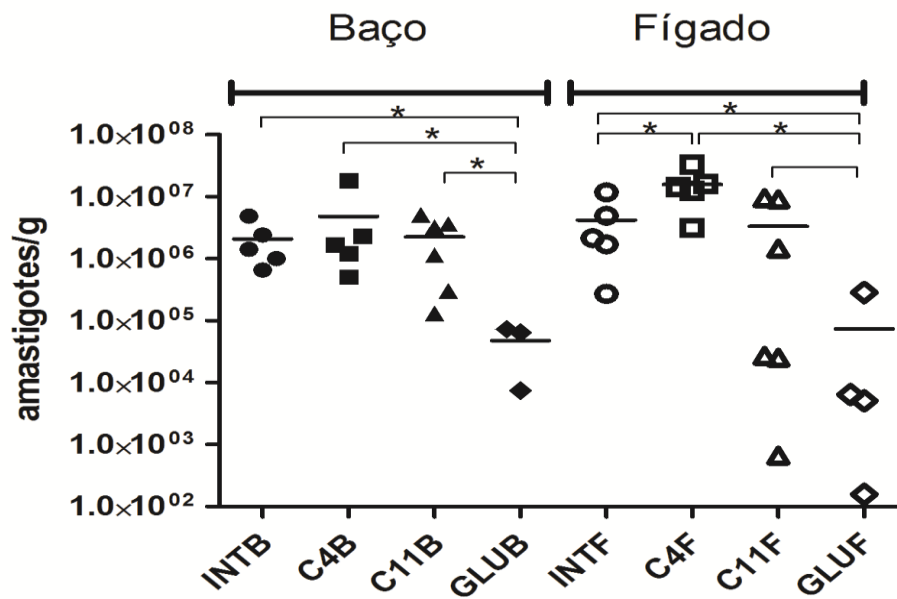


Figura 11 - Carga parasitária determinada por qPCR de fragmentos de baço e fígado de hamster infectados com *L. (L.) infantum chagasi*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Carga parasitária de fragmentos de baço e fígado de hamster infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e tratados com C11, C4 e GLU. A carga parasitária qPCR e as análises estatísticas por Tukey ($p < 0,05$).

6.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA HEPATOESPLÊNICA

A seguir serão descritos as avaliações histopatológicas do fígado e do Baço.

6.2.1 Avaliação histopatológica do Fígado

Os animais dos grupos INT, C11, C4 e GLU apresentaram como principais alterações histológicas, a presença de vasos com infiltrado periportal (figura 13 b, c, d) e a presença de granulomas (14 b, c, d, e). Nos grupos INT e C4 observou-se um intenso infiltrado periportal. Já nos grupos C11 e GLU observou-se uma maior preservação dos espaços periportais mesmo que tenha sido observado infiltrado,

mas em menor proporção quando comparados com os grupos INT e C4. Sendo então estes classificados com moderado infiltrado periportal. O grupo NINT não apresentaram infiltrados periportais. Em relação ao número de granulomas, os grupos tratados com C4 e C11 apresentaram um aumento significativo no número de granulomas, sugerindo-se uma intensa resposta inflamatória no fígado com intuito de conter a infecção (Figura 12).

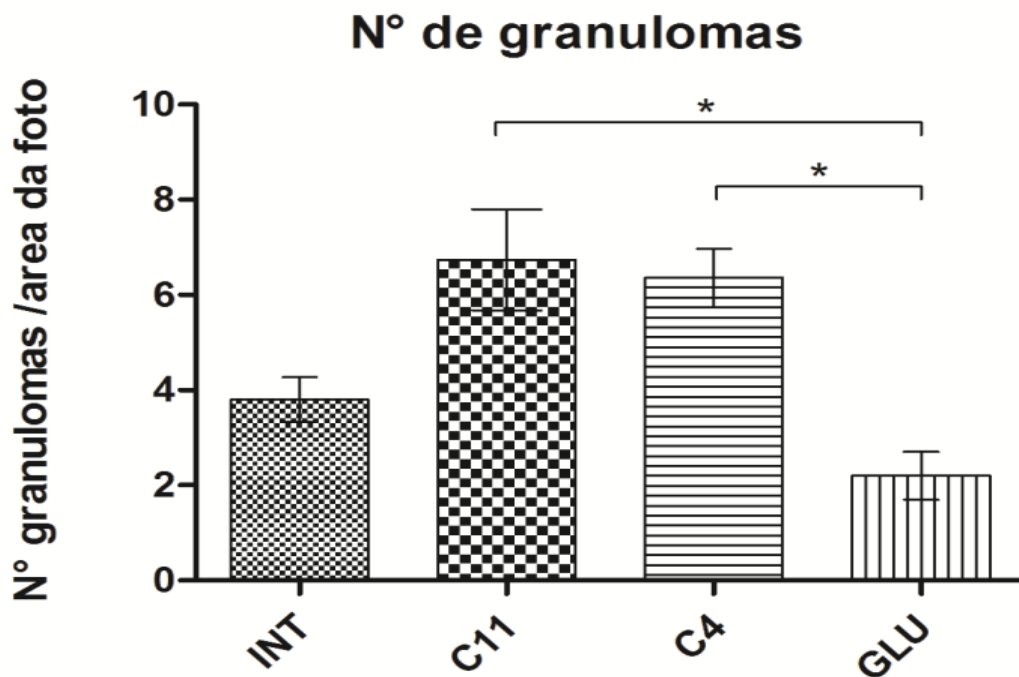


Figura 12- Média do número de granulomas observados no fígado por área da foto.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foram contados o numero de granulomas na por área da foto na objetiva 40X.

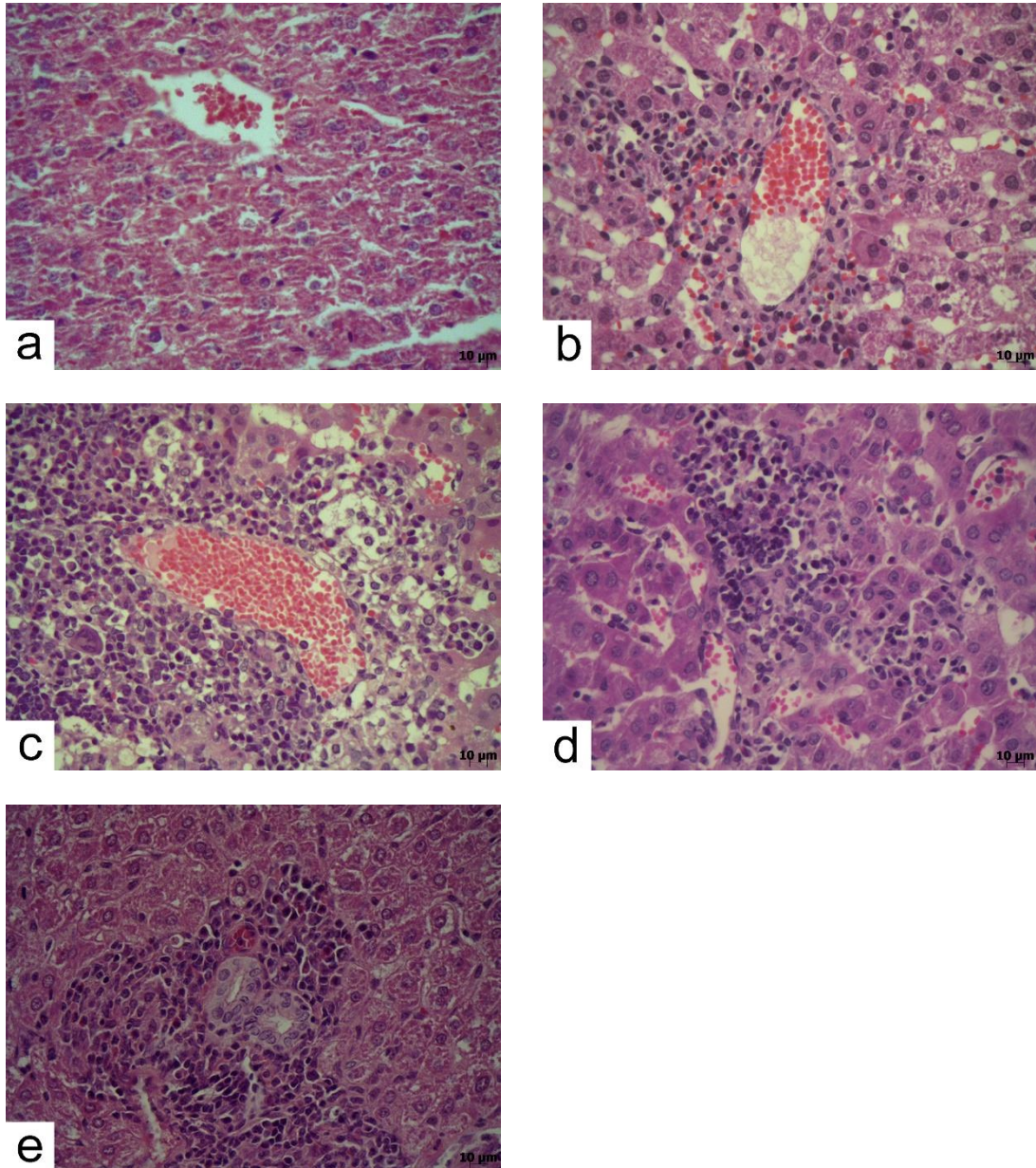


Figura 13: Fotomicrografias de secções histológicas do fígado de hamsters *Mesocricetus auratus* inoculados com *L.(L.) infantum chagasi* (cepa BH46), observação da intensidade dos infiltratos segundo os tratamentos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Observação da intensidade dos infiltratos. Em A, temos o grupo controle não infectado e não tratado (NINT). Em B, C e D, temos os tratados respectivamente por C11, C4 e GLU e em E, o grupo INT, objetiva de 40X.

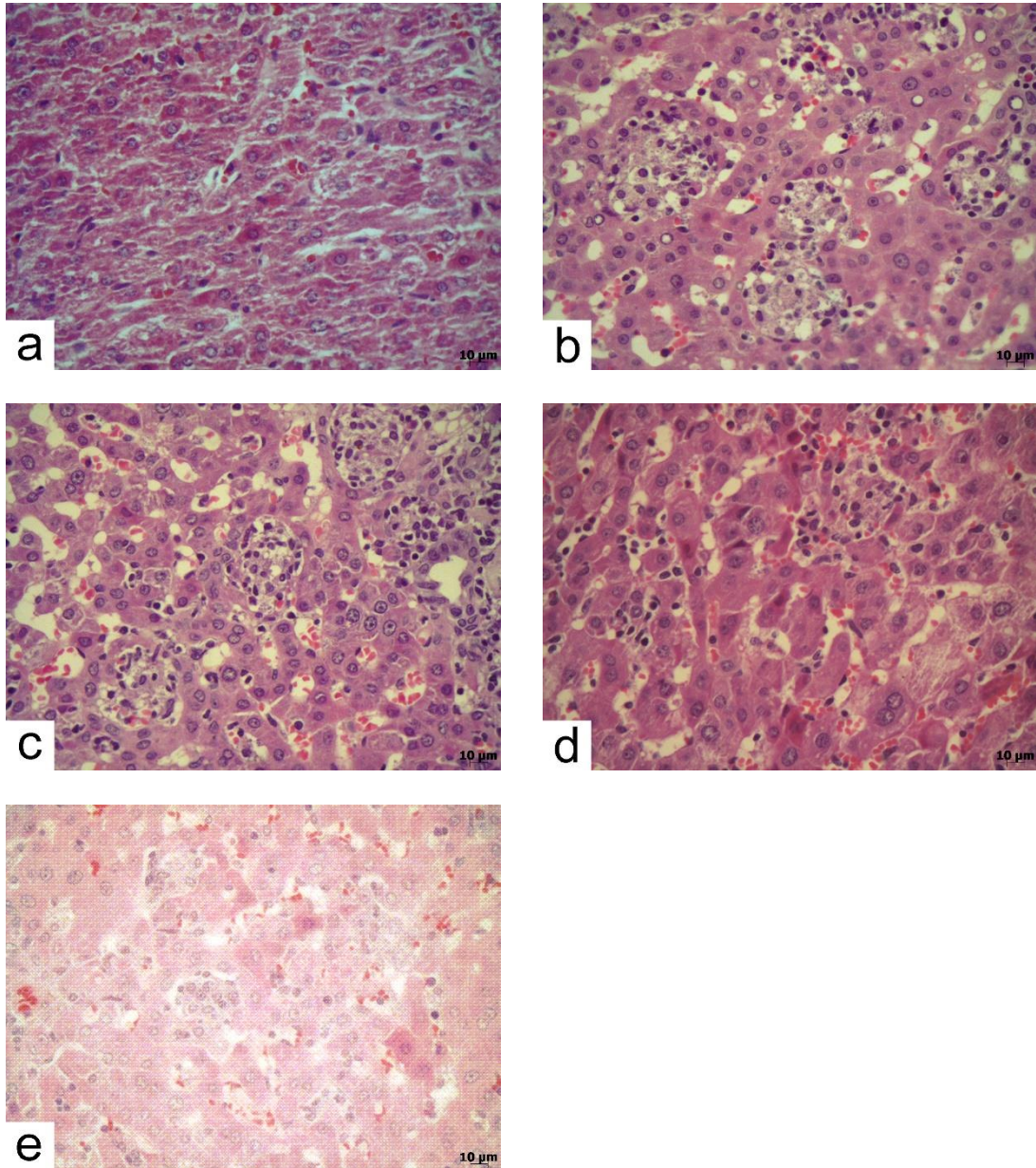


Figura 14: Fotomicrografias de secções histológicas do fígado de hamsters *Mesocricetus auratus* inoculados com *L.(L.) infantum chagasi* (cepa BH46), observação do número de granulomas segundo os tratamentos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Observação do número de granulomas por área da foto. Em A, temos o grupo controle não infectado e não tratado (NINT). Em B, C e D, temos os tratados respectivamente por C11, C4 e GLU e em E, o grupo INT, objetiva de 40X.

6.2.2 Avaliação histopatológica do Baço

Após análise do material na objetiva de 10X, foi possível verificar que no baço dos animais controle NINT possuía a arquitetura histológica preservada (Figura 17

a), e através deste controle analisamos as alterações dos demais grupos (Figura 15). Nas análises do grupo Infectado e não tratado (INT) observou-se uma substituição dos folículos linfóides por macrófagos infectados, ou seja, houve uma perda da arquitetura do órgão com a substituição da Polpa Branca (PB) por Polpa Vermelha (PV) (Figura 17 e). A perda de área linfocitária pode levar esses animais a uma imunossupressão e agravar a doença. Para os animais tratados, o grupo tratado com composto C11, apresentou uma maior preservação da PB sugerindo uma melhor resposta imunológica do hospedeiro após o tratamento (Figura 52 b). O parasitismo do órgão foi analisado também através da contagem de macrófagos infectados por área da foto e resultado foi expresso pela média. Essa análise foi realizada em objetiva de 40X, e demonstrou que os hamsters dos grupos C4, C11 e GLU apresentaram cerca de 17, 10 e 5 macrófagos infectados por foto, apresentaram uma redução significativa na contagem de macrófagos infectados comparados ao grupo INT que apresentou cerca de 34 macrófagos por foto. O grupo tratado com C11 se apresentou semelhante em relação ao tratado com GLU na eficácia de redução no número de macrófagos infectados, uma vez que entre eles não apresentou diferença estatística significativa (Figura 16).

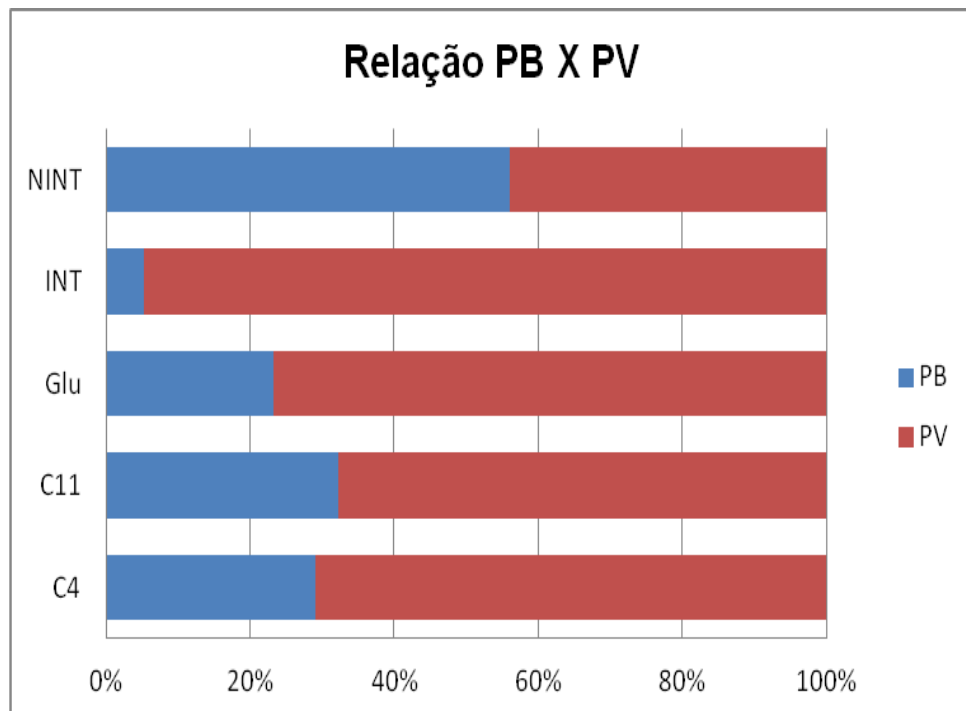


Figura 15- Relação de porcentagem de Polpa Branca (PB) e Polpa Vermelha (PV).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Análise da perda de morfologia do baço após infecção, através da avaliação segundo a porcentagem de PB e PV em reação ao controle NIN.

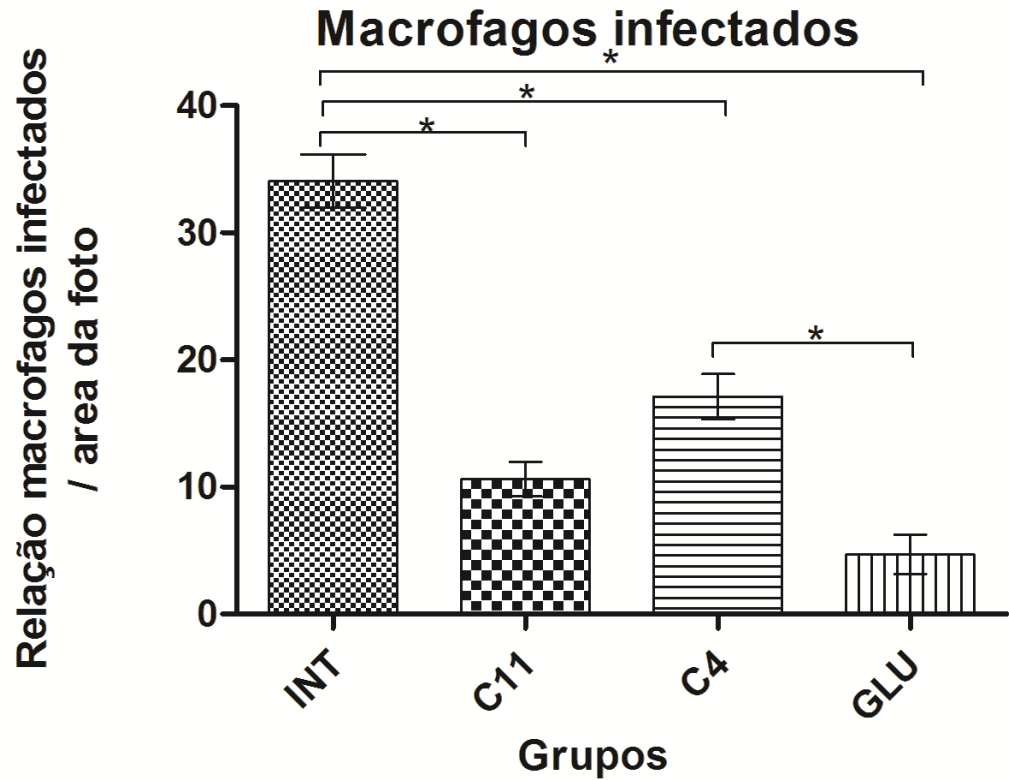


Figura 16- Contagem de macrófagos infectados no baço pela área da foto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A contagem de macrófagos infectados no baço foi realizada na objetiva de 40X, o resultado foi expresso por média. Os grupos com * apresentam diferença significativa ($p < 0.05$ - Tukey).

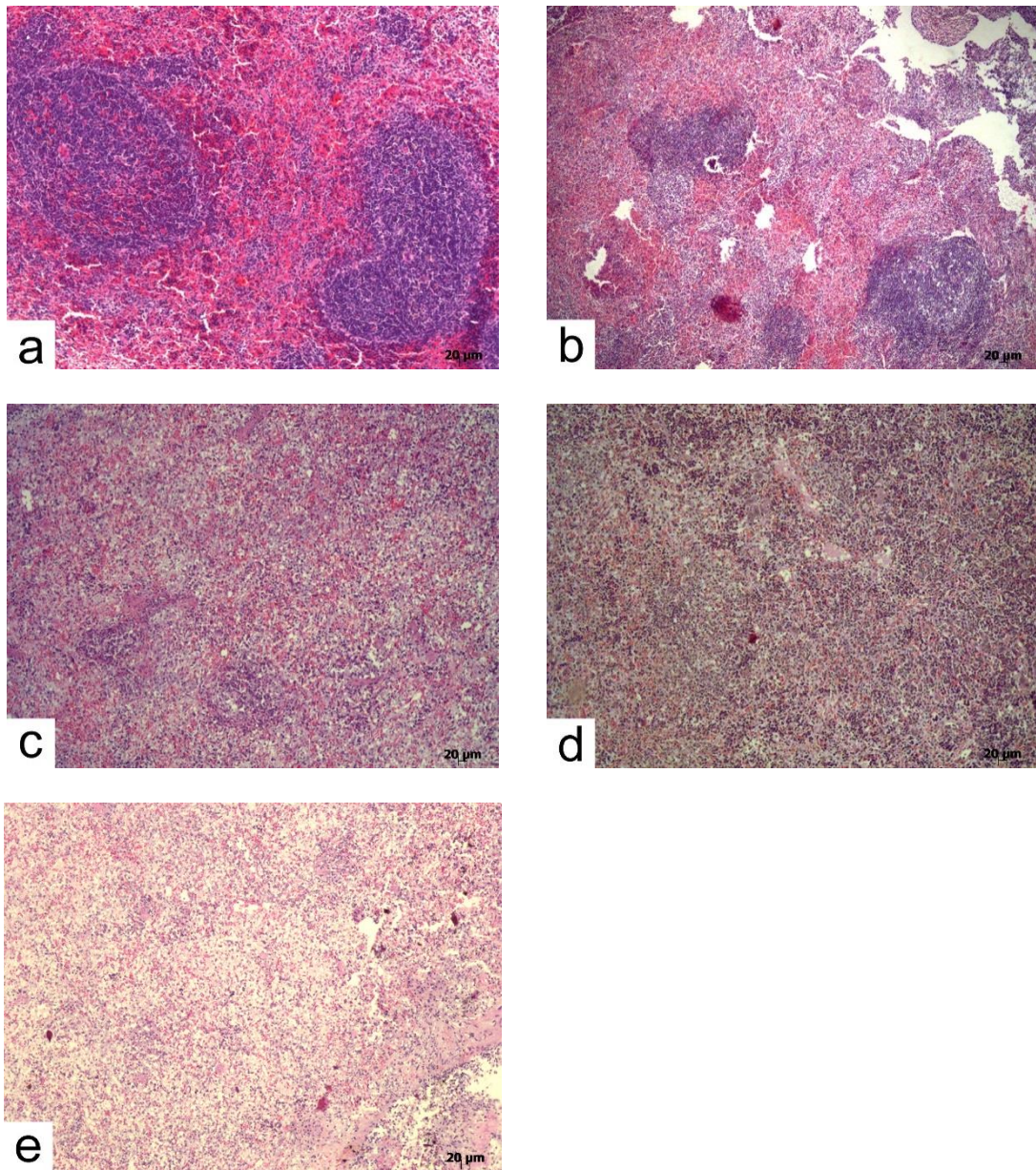


Figura 17- Fotomicrografias de seções histológicas do baço de hamsters *Mesocricetus auratus* inoculados com *L.(L.) infantum chagasi* (cepa BH46).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Observação da preservação da arquitetura do baço na objetiva de 10X. Em A, temos o grupo controle não infectado e não tratado (NINT). Em B, C e D, temos os tratados respectivamente por C11, C4 e GLU e em E, o grupo INT.

6.3 AVALIAÇÕES DA EXPRESSÃO RELATIVA DAS CITOCINAS PROINFLAMATÁRIAS TNF-A, IFN-Y, IL-17 E ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10, IL-4 E TGF-B NO BAÇO.

Abaixo serão descritos as avaliações da expressão relativa das citocinas pró e anti-inflamatória.

6.3.1 Avaliação da expressão relativa das citocinas proinflamatórias TNF- α , IFN-Y, IL-17 no baço.

A expressão relativa de mRNA das citocinas IL-17, IFN-y TNF- α foi avaliada quantitativamente pela técnica RT-qPCR no baço de hamster experimentalmente infectados e comparados com um grupo controle infectado e não tratado (INT). Os resultados estão representados por Δ Ct da expressão relativa de mRNA/citocinas na Figura 18.

Em relação à expressão relativa de mRNA de IL-17 e TNF- α , pode se observar um aumento significativo nos grupos C11, C4 e GLU, comparados com o grupo controle INT. Em relação a IFN-y, observou-se uma redução significativa na expressão de mRNA no grupo C4 comparado com INT, já os grupo GLU teve um aumento significativo da expressão.

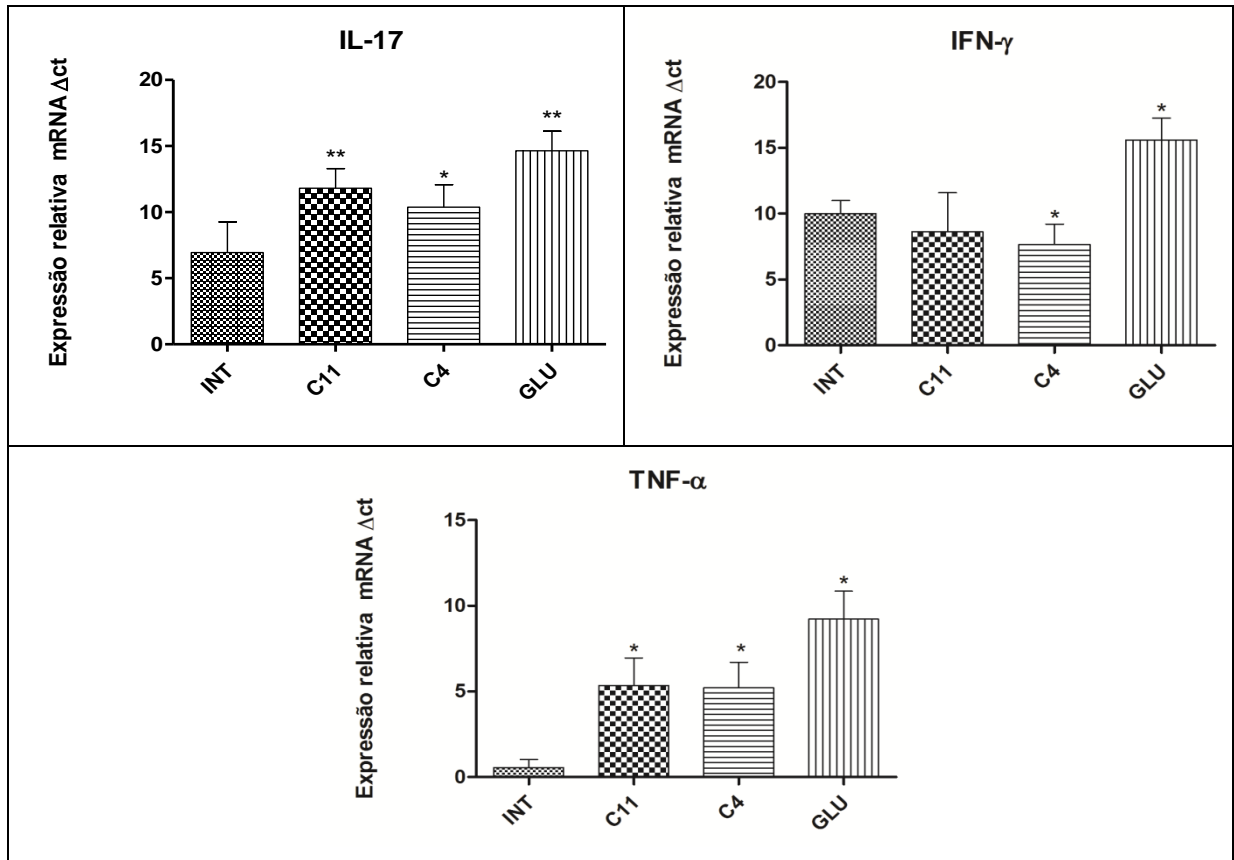


Figura 18 - Expressão relativa de mRNA expressos em Δ ct das citocinas pró-inflamatórias IL-17, IFN- γ e TNF- α no baço de hamster.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias citocinas IL-17, IFN- γ e TNF- α no baço, comparados com grupo controle NINT e INT. Os resultados estão expressos com média \pm desvio padrão. Diferenças significativas teste t ($p < 0.05$) estão representadas por *.

6.3.2 Avaliação da expressão relativa das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4 e TGF- β no baço

A expressão relativa de mRNA das citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β , foi avaliada quantitativamente pela técnica de RT-qPCR no baço de hamster experimentalmente infectados e os resultados estão representados por expressão relativa de mRNA/citocinas Δ Ct na Figura 19. Foi observado uma redução significativa na expressão relativa de mRNA da citocina IL-10 no grupo C11 quando comparados com o grupo INT. Em relação à expressão relativa de mRNA da citocina IL-4 e TGF-

β os grupos C11, C4 e GLU tiveram um aumento significativo comparado com o grupo INT.

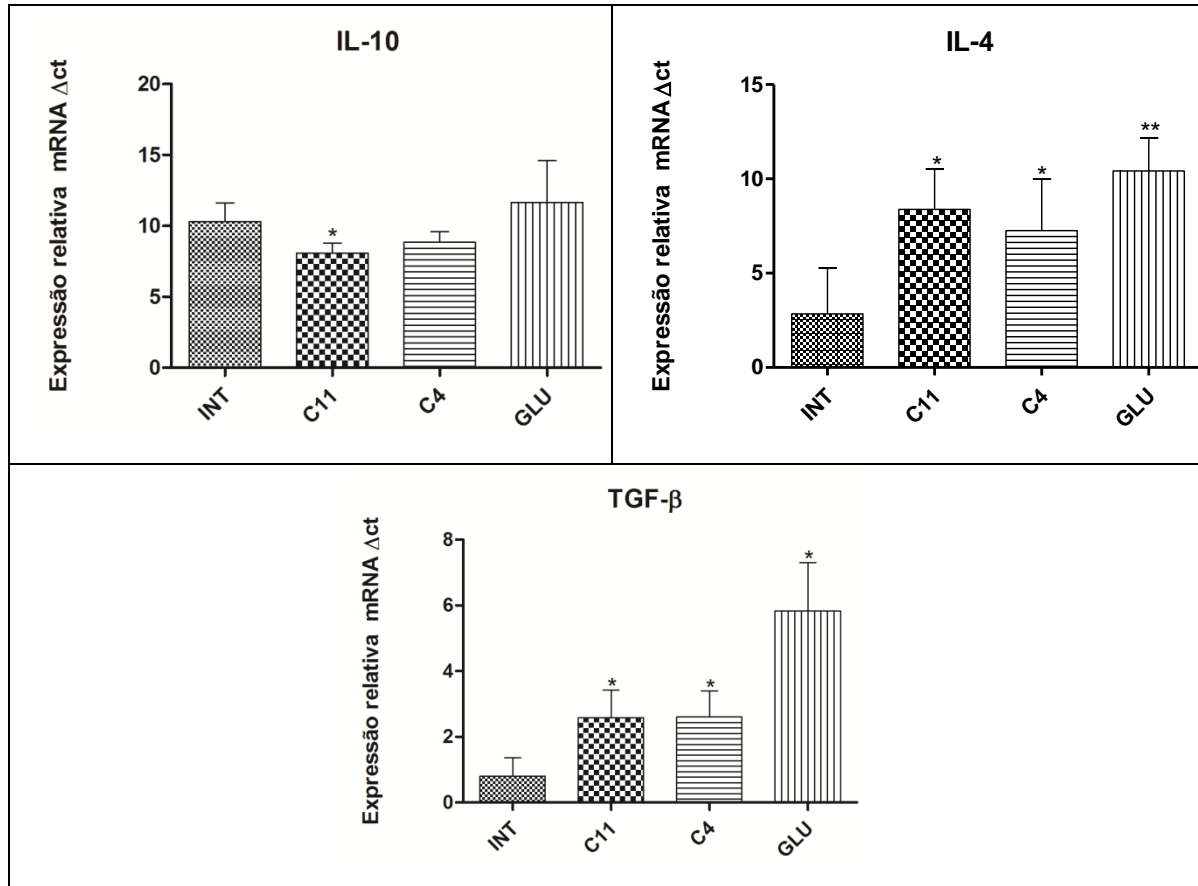


Figura 19 - Expressão relativa de mRNA das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4 E TGF-β no baço de hamster.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Expressão relativa de mRNA das citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-4, TGF no baço de hamster infectados e tratados com C11, C4 e GLU e comparados com grupo controle INT. Os resultados estão expressos com média +/- desvio padrão. Diferenças significativas teste t Mann Whitney ($p < 0.05$) estão representadas por *.

O perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por grupo de tratamento está representado abaixo na figura 20.

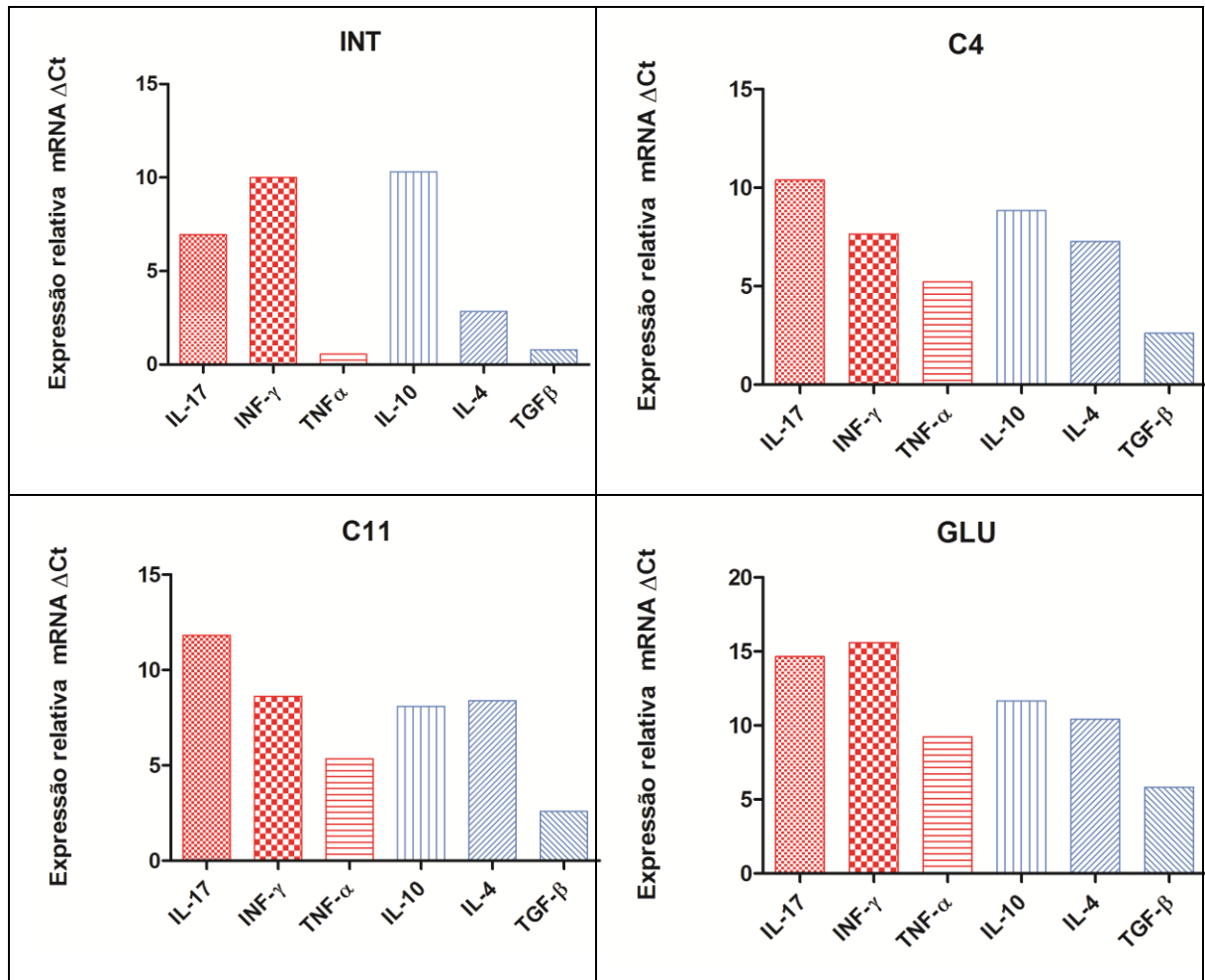


Figura 20 - Perfil das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por grupo de tratamento.
 Autor: Elaborado pela autora.

7 DISCUSSÃO

As leishmanioses são um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, pois os recursos terapêuticos são limitados e há um aumento crescente na resistência destes fármacos disponíveis, além da não existência de uma vacina eficaz comprovada (BRASIL, 2016). Para a descoberta de novos fármacos é necessário o uso de modelos experimentais *in vivo*, que reproduzam os principais eventos clínicos patológicos decorrentes da infecção (MELBY et al,2015). Assim, no presente estudo foi utilizado como modelo experimental *in vivo* o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) para o teste da atividade leishmanicida de compostos análogos a miltefosina, em busca de resultados que reduzam sua toxicidade e aumentem sua efetividade. Segundo MOREIRA (2012) o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) reproduz diversas características da LV humana, como manifestações clínicas, alterações hematológicas, bioquímicas, histológicas e imunológicas. Melby (2015) em seu estudo demonstra que as características clinico-patológicas e os mecanismos imunopatológicos da LV em hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) são semelhantes à doença humana e que se diferem do modelo murinho (principalmente camundongos) comumente utilizado (NIETO, 2011). Os modelos murinos que não os hamsters não desenvolvem a doença de forma evidente e progressiva, pois controlam a infecção através da geração de NO, um mecanismo efetivo que não tem um papel claro na função antimicrobiana de macrófagos humanos (MELBY et al.,2015).

A quantificação da carga parasitaria é de fundamental importância para um melhor entendimento das manifestações clínicas e do comportamento do modelo animal frente a uma infecção e sobre sua reação aos compostos testados com uma almejada redução de carga parasitária (COLOMBO et al.,2017). A técnica utilizada neste trabalho para quantificar esta carga no baço e no fígado foi a PCR real time (qPCR). A qPCR é uma técnica muito sensível que vem sendo muito utilizada entre os pesquisadores, a qual permite um alto nível de sensibilidade e o monitoramento da evolução da doença pela rápida resposta de carga parasitária (SRIVASTAVA et al., 2013) . A carga parasitária no fígado dos animais tratados com composto C11 foi estatisticamente semelhantes aos tratados com o Glucantime, mostrando uma possível ação deste composto neste órgão, o qual sofre uma ação específica do

parasito. Sugere-se que um possível aumento da concentração do composto associado a maior esquema posológico possa refletir em melhores resultados tanto no fígado quanto no baço, a busca por fármacos de ação no fígado é de grande importância considerando que o fígado é um alvo do parasito, e tentativas de aumentar a eficácia de fármacos no fígado já vem sendo estudadas. New e seus colaboradores desde 1978 fizeram testes com o intuito de melhorar a ação dos compostos antimoniais, estes foram encapsulados em lipossomas convencionais e testados em modelo experimental de leishmaniose visceral, e essas preparações se revelaram cerca de 200 vezes mais eficazes no fígado que o antimonial não encapsulado na eliminação do parasito no fígado.

Na LV experimental em hamster o fígado e o baço também apresentam uma resposta imune órgão específica que provocam alterações nestes órgãos (ROUSSEAU et al., 2001). No presente trabalho as principais alterações histopatológicas observadas no fígado foram à presença de infiltrado periportal e granulomas, cuja intensidade variou de acordo com o tipo de tratamento empregado. Nos animais tratados com C11 e GLU foi observado o desenvolvimento de um processo inflamatório caracterizado pela presença de um moderado infiltrado de células inflamatórias correlacionando com seu baixo parasitismo, o que os diferiu dos demais grupos de tratamento que apresentaram um intenso infiltrado inflamatório correlacionando com alto parasitismo. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Riça-Capela et al. (2003) e Jesus, (2015), sugerindo a importância do fígado na patogênese da doença. E assim foi demonstrado pela primeira vez que o composto C11 tem ação antiparasitária no fígado de hamster infectados com *L. infantum*. No presente estudo a formação de granuloma hepático estava intensa nos grupos tratados com C4 e C11 e com menor frequência no grupo tratado com GLU e no grupo INT. A resposta imune eficiente em infecção por *Leishmania* no fígado é intimamente dependente da formação de granulomas hepáticos (VIANNA et al., 2002), para a tentativa eficaz de controlar a infecção com auxílio dos compostos o que explicaria o seu número aumento nestes grupos. O grupo tratado com GLU apresentou uma redução significativa, acredita-se que esteja relacionada com o momento de análise uma vez que a carga parasitária já foi reduzida. O grupo INT apresentou menor número de granulomas, pois havia no lugar tecido fibroso e necrose, decorrente da não resolução e progressão da doença, dados que já foram descritos por Mangoud et al (1997) que mostrou em seus

estudos que a evolução da infecção de hamster infectados com *L.(L.) infantum* leva em primeiro momento o aumento do número de granuloma com a formação posterior de fibrose, e necrose.

As principais alterações observadas no baço foi depleção de polpa branca, hiperplasia polpa vermelha caracterizando uma perda da arquitetura normal do baço, com substituição parcial a total da polpa branca (PB) por células da polpa vermelha (PV). Esses achados foram observados no presente estudo em uma intensidade menor nos grupos tratados com C11 quando comparados com INT e GLU, mostrando que de alguma forma o composto é capaz de preservar melhor a arquitetura do órgão mantendo mais de 50% da polpa branca contra 9% do grupo INT, em relação ao grupo saudável. Essas alterações foram descritas também na LVC, onde os animais apresentaram no baço a presença de depleção folicular de polpa branca, hiperplasia de polpa vermelha com a presença de linfócitos, macrófagos e neutrófilos (FREIRE, 2014; BARROS, 2011). O baço é um órgão que desempenha um papel principal na LV, visto que é o local de maior persistência do parasito, e também o local responsável por geral uma imunidade específica para tal, assim sofre as ações da resposta imune o que gera grandes alterações histopatológicas (OLIVEIRA, 2009; KAYE et al.,2004).

A resposta imune celular foi avaliada nos fragmentos de baço dos diferentes grupos experimentais com o intuito de explicar a diferença na evolução da doença nos grupos de tratamento. Então no presente estudo avaliou-se a expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-17) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) no baço dos grupos infectados e tratados. Na LV em hamster e na LVC, assim como na LV humana a infecção induz a uma resposta imune humoral e celular, mas esta não é capaz de controlar a infecção. A progressão da carga parasitária visceral pode ser devido à expressão aumentada de citocinas tipo Th2 sabidamente relacionadas com a susceptibilidade à doença, diferentemente do que ocorre com a resistência a infecção, onde se espera uma resposta Th1 com produção de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-17 (TRINCHIER et al.,2007).

Nascimento 2014 mostrou em seus estudos a importância do padrão Th17, na imunidade da LV por *L.(L.) infantum chagasi*, uma vez que os camundongos C57BL/6 nocautes para IL-17 apresentaram uma maior carga parasitária nos órgãos alvos da infecção fígado e baço. Concluiu também que os mecanismos efetores das células Th17 estão envolvidos com a resistência do hospedeiro e envolve uma

regulação negativa da produção de IL-10, aumentando a capacidade linfoproliferativa e potencializando a produção de NO, assim demonstrou uma relação entre o aumento de IL-17 e a redução de IL-10. Essa relação foi observada no presente trabalho com o grupo tratado com o análogo C11, ou seja, foi observado um aumento de IL-17 e a redução de IL-10 comparado como grupo INT.

No presente estudo em nossos resultados foi possível observar um aumento significativo da expressão de IL-10 e redução de TNF- α no grupo infectado e não tratado, caracterizando a progressão da doença e a susceptibilidade dos hamsters. Resultados similares foram observados no trabalho de Guptat et al., (2011) no grupo infectado e não tratado, com um aumento significativo da expressão de mRNA de IL-4, IL-10 e TGF- β e uma diminuição de TNF- α , INF- γ e IL-12. Moreira (2012), também analisando a infecção em hamster por *L. (L.) infantum chagasi*, pela via intracardíaca, observou que o perfil da resposta imune apresentou uma elevada expressão de IL-10 e TGF- β indicando uma supressão dos animais, permitindo o estabelecimento da infecção ativa e proliferação do parasito. Correa e colaboradores (2007) demonstraram em seus estudos que na LVC animais sintomáticos apresentavam maior expressão de TGF- β e IL-10 tanto no fígado quanto no baço, sendo determinantes na progressão da doença. No presente trabalho os grupos tratados com os análogos a miltefosina C4 e C11 apresentaram um aumento da expressão RNAm das citocinas IL-17 e TNF- α (Th1) e uma redução da IL-10 (Th2), mostrando que estes compostos podem modular de maneira benéfica a imunidade. Similarmente, Guptat e colaboradores, (2011) mostraram em seus estudos que hamster com LV tratados com miltefosina, apresentaram um notável aumento na expressão de citocinas Th1 (INF- γ , TNF- α) e uma diminuição significativa na expressão de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-10 e TGF- β), mostrando um efeito restaurador da imunidade favorecendo resistência à doença.

A síntese dos análogos da Miltefosina, os compostos C4 e C11, foram realizados através de modificações racionais da estrutura química, o que é conhecido como bioisosterismo. Essas alterações visam alterar aspectos que melhorem a sua solubilidade, afinidade com receptor alvo, a eficácia e a especificidade, biodisponibilidade e duração de ação, diminuindo, se possível, a toxicidade e os efeitos adversos (PATANI et al., 1996; THORNBURGER et al., 1957). Esta estratégia vem sendo amplamente utilizada nas indústrias farmacêuticas para descobrir novos análogos comercialmente atraente, uma vez que partindo

de composto já conhecido se tem mais informações sobre suas ações o que agiliza todo processo de descoberta de novos fármaco (COSTA et al., 2013; LIMA E BARREIRO, 2005).

Uma correlação entre carga parasitária, alterações histopatológicas e imunológicas são essenciais para o entendimento da evolução da Leishmaniose visceral, assim como no presente estudo vários autores relatam essa correlação (MELBY et al., 2015; ALBUQUERQUE, 2013; MOREIRA, 2012; GUPTAT, 2011; PITTA et al., 2009; ALVES, 2008; CORREA et al., 2007; STANLEY;ENGWERDA, 2007; LIEW et al.,1993), onde podemos observar no presente estudo que os animais do grupo C11 foi capaz de reduzir a carga parasitária do fígado, manteve melhor a arquitetura do baço, assim como apresentou um perfil de expressão de citocinas mais favorável a resistência a leishmaniose visceral com aumento da expressão de IL-17 e TNF- α e uma redução de IL-10. O grupo tratado com o Glucantime diminuiu a carga parasitária, possivelmente em relação aumento de INF- γ (Th1), mas não foi capaz de mantem a arquitetura do órgão, mostrando grande perda dos nódulos da polpa branca do baço.

Considerando-se o aumento dos relatos de falha do tratamento da LV, o entendimento da resposta imune frente ao parasito se torna de extrema importância, uma vez que a modulação da resposta imune do hospedeiro pode ser uma estratégia de melhor eficácia de um futuro fármaco que além de levar a morte do parasita simultaneamente leva a uma imunidade contra a doença.

8 CONCLUSÃO

- Os compostos C11 e C4 não foram capazes de reduzir a carga parasitária, de maneira significativa comparados com o grupo INT;
- O Grupo tratado com o composto C11 apresentou carga parasitária no fígado similar estatisticamente ao grupo tratado com Glucantime;
- O grupo tratado com o composto C11 apresentou uma maior preservação da arquitetura do baço quanto comparado ao grupo tratado com Glucantime;
- O grupo tratado com o composto C11 apresentou uma maior expressão das citocinas IL-17 e TNF- α , e uma diminuição de IL-10 quando comparados com o grupo Infectado Não Tratado, de forma significativa;
- O perfil de citocinas expressas no grupo tratado com o composto C11 se mostrou similar aos expressos no grupo tratado com o Glucantime;
- Estes dados indicam que o C11 pode ser um promissor composto a ser usado no tratamento da Leishmaniose visceral, uma vez que apresentou alguns resultados positivos contra a doença no modelo experimental em hamster.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar novamente o Composto C11 em diferentes concentrações, avaliando a carga parasitária, alterações histopatológicas e resposta imunológica;
- Usar como controle a Miltefosina.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. D. R. de. **Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina**. 2013. 65f. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas – Centro de Biociências, Universidade Federal de Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2013.
- ALVES, C. F. **Determinação de Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) Com e sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral**. 2008. 206f. Tese de Doutorado em Parasitologia- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2008.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on anexpanding zoonosis: part one. **Trends Parasitology**, v.24, n. 7, p.324–330, jul. 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORN FAR). **Revista Química Nova**. Rio de Janeiro, v.28, p.56-63, 2005.
- BARROS, R. M. **Caracterização Histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal**. 2011. 103f. Dissertação de Mestrado em Saúde animal-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília, DF, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. v.3, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE . **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde. v 1, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, v.7, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde Brasil 2008 : 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil**. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.
- CASTELO BRANCO, P. V. et al. The antileishmanial drug miltefosine (Impavido®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 806, n. 1, p.34–39, jun. 2016.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267–274, jan. 2011.

CORRÊA, A.P.F.L. et al. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10 and interferon-gamma in males symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Parasitol**, v.143, p.267-274, fev. 2007.

COSTA, F. N. et al. Synchrotron X-ray powder diffraction data of LASSBio-1515: A new N-acylhydrazone derivative compound. **Radiation Physics and Chemistry**, v.95, p.292-295, fev. 2014.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 697-712, 2005.

DA LUZ, J. S. B. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* Promastigotes Forms Treated In Vitro with Usnic Acid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–7, jan. 2015.

DORLO, T.P.C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n.11, p. 2576-2597, nov. 2012.

ESPURI, P. F. **Avaliação da Atividade Leishmanicida de Composto Orgânicos Contendo Prata em sua Estrutura**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Alfenas, MG, 2017.

FERNÁNDEZ, O. L. et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p.3026, mai. 2014.

FORATTINI, O. P. *Ecologia, Epidemiologia e Sociedade*. São Paulo: Artes Médicas. **Cad. Saúde Pública**, v.9, n.2, jun. 1992.

FREIRE, S. M. et al. Dinâmica das alterações do baço associadas ao estado clínico de cães com leishmaniose visceral* . **R. bras. Ci. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 27-32, mar. 2014.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al . Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.2, p.11-19, dez. 2012.

GALATI, E.B. et al. *Phlebotomines* (Díptera: *Psychodidae*) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-390, ago. 1997.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J.Infect. Dis.**, v. 204, n. 7, p.

1134-1137, out. 2011.

GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdian involves T-helper 17 cytokines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016–25, mar. 2013.

GONTIJO, V. S., et al. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, n. 2015, p. 24–33, jun. 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 615-23, abr. 2004.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 51, n. 5, p. 241-246, set. 2009.

GUEDES P.M.M. et al. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. 604, fev. 2010.

GUO L, et al. In TH2 cells the Il4 gene has a series of accessibility states associated with distinctive probabilities of IL-4 production. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 16, p.10623– 10628, jun. 2002.

GUPTAT, R. et al. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 2, p. 440-443, fev. 2011.

JESUS, J. A. **Análise da ação terapêutica dos ácidos oleanólico e ursólico na leishmaniose visceral experimental**. 2015. 124f. Dissertação de Mestrado em Biologia Química da Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, SP, 2015.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J. Immunol**, v. 166, n. 2, p. 1141-1147, jan. 2001.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v.9, n. 8, p. 604-615, jul. 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, p. 37–42, out. 1990.

KOLLS, J. K.; ANDERS, L. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, out. 2004.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick, K. *The Leishmaniasis in biology and medicine*. London:Academic Press, v. 1, n. 1, p. 1-120, 1987.

LAISON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis: The Neotropical Leishmania species. **Parasitology**, v. 5, p. 241-266, out. 1998.

LEPROHON, P. C et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 5, n. 1, p. 26–35, abr. 2015.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 32, p.161-259, 1993.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LOIOLA, C. F.; SILVA, D. A.; GALATI, E. A. B. Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and species abundance in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 581–585, ago. 2007.

MELBY, P.C. et al. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1912-1920, nov. 2015.

MENDEZ, S. et al. Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J. Exp. Med**, v. 200, n.2, p. 201-210, jul. 2004.

MINISTERIO DA SAUDE. ESPLANADA DOS MINISTÉRIOS BLOCO G.BRASILIA-DF. Disponível em:<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>>. Acesso em 5 de Dezembro 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE . Portal da Saúde . Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs.>> Acesso em 5 de Dezembro de 2017.

MOORE, E. M; LOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral Leishmaniasis. **J Glob infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 151-158, abr. 2010.

MOREIRA, N. D.et al. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of Leishmania (Leishmania) infantum: 'Leishman Donovan Units' versus Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v.7, n. 10, p. 1–11, out. 2012.

MOREIRA, P. R.R. **Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães com leishmaniose visceral**. 2013. 66f. Tese de doutorado em Medicina Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

NASCIMENTO, M. S. L., et al. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against Leishmania infantum Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n.6, p. 1015–1026, mar. 2015.

- NASCIMENTO, M.S.L **Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum/chagasi***. 2012. 119f. Dissertação de Mestrado em Imunologia básica e aplicada -Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2012.
- New, R.R. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. **Nature**, v. 272, n.5648, p. 55-56, mar. 1978.
- NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Vet Res**, v.42, n.1, p. 39, fev. 2011.
- NOVOA, R. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. Braziliensis* Infection. **Parasite immunology**, v. 33, n. 2, p. 132–136, Fev. 2012.
- NYLEN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+ CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med**, v. 204, n. 4, p. 805-817, Mar. 2007.
- OLIVEIRA CI, et al. Animal models for infectious diseases caused by parasites:leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 1, n. 1, p. 81-86, Oct. 2004.
- OLIVEIRA, E. de. **Parasitismo e alterações histológicas em hamsters infectados com tecido medular de pacientes portadores de Leishmaniose visceral**. Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS. Campo Grande, MS, 2009.
- PATANI, G. A., LA VOIE, E. .,J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chem. Ver.**, v. 96, n. 8, p. 3147-3176, Jul. 1996.
- PITTA, M. G. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J Clin Invest**, v. 119, n. 8, p. 2379-2387, Aug. 2009.
- RANGEI, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937–954, Nov. 2009.
- REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 214-239.
- RIÇA-CAPELA M. J, et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitol Res**, v. 89, n. 3, p. 163-169, Mar. 2003.
- RODRIGUES, O. R. et al. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**. v. 214, n. 2, p. 101-111, Fev. 2009.
- ROUSSEAU D, et al. *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol**, v. 1, p. 1-17, Aug. 2001.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 11, p. 1668-1679, Aug. 2011.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, May. 2004.

SOUZA, W. **Protozoologia Médica**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio Ltda. 2013.p.125-152.

SRIVASTAVA, A. et al. Real-time PCR to quantify *Leishmania donovani* in hamsters. **J Parasitol**, v. 99, n. 1, p. 145-150, Feb. 2013.

STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden hamster. **J. Protozool**,. v. 5, p. 268-273, 1958.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J Exp Med**, v. 204, n. 2, p. 239-243, Feb. 2007.

VIANNA, V. L. et al. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitol Res**, v. 88, n. 9, p. 829-36, Sep. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Leishmaniasis**. Geneva, 2015.
Disponível em < <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> >. Acesso em 27 de novembro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **HIV/AIDS**. Geneva, 2015.
Disponível em: < <http://www.who.int/hiv/en/> > Acesso em 27 de novembro de 2017.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Avaliação da atividade leishmanicida de compostos análogos da miltefosina", registrada com o nº 21/2017, sob a responsabilidade de Marcos José Marques, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 01/06/2017 a 31/12/2017	
Espécie/linhagem/raça	Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>	
Nº de animais	30	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério de Criação da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP	

Alfenas, 23 de Maio de 2017.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida