



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE TIAZÓIS SOBRE *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)

RECIFE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE TIAZÓIS SOBRE *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Co-orientadores: Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48a

Oliveira, Vinícius Vasconcelos Gomes de

Aspectos relacionados à transmissão e à atividade biológica de tiazóis sobre *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) / Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira. – 2017.
136 f.: il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Coorientadores: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo, Leucio Câmara Alves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências e apêndice(s)..

1. *Leishmania* sp. 2. Embrião 3. Leishmanicida
4. Citotoxicidade 5. OECD I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orient. II. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de, coorient. III. Alves, Leucio Câmara, coorient. IV. Título

CDD 636.089

VINÍCIUS VASCONCELOS GOMES DE OLIVEIRA

ASPECTOS RELACIONADOS À TRANSMISSÃO E À ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
TIAZÓIS SOBRE *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)

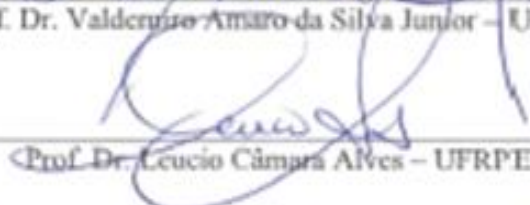
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco como parte dos requisitos para
obtenção do grau de doutor em Biotecnologia Animal.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior – UFRPE



Prof. Dr. Leucio Câmara Alves – UFRPE



Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley – UNCISAL



Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo – CPqAM/FIOCRUZ



Dr. Paulo André Teixeira de Moraes Gomes – UFPE

RECIFE

2017

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese, foi utilizar apenas três páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte de minha trajetória acadêmica desde os meus primeiros passos no maternal até a titulação do doutorado... Passaram-se 27 anos. Permitam-me agradecer por todo este período, pois a titulação máxima em nível acadêmico só é conseguida após sólida base em todos os níveis escolares.

Como não poderia deixar de ser, agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela ajuda e proteção, pela sua força e presença constante, e por me guiar à conclusão de todas as preciosas etapas de minha vida;

À minha rainha e meu alicerce, Vera Cristina Gomes de Oliveira, minha mãe. Por ser a pessoa que ora por mim todos os dias e noites. Por ser a pessoa que me apoia em todas as decisões corretas e a mesma que pune nas decisões erradas. Obrigado por todas as “palmas educativas”, conversas e orientações. Obrigado por ser a pessoa que não chorou na minha frente quando partir para Recife em busca de meus sonhos e, ao contrário, mostrou-se muito forte e incentivadora. Obrigado por ser um dos principais personagens na obtenção desta conquista;

À Josemildo Vasconcelos de Oliveira, meu pai, por ter contribuído para minha formação pessoal e pelas lições de vida. Obrigado por ser a pessoa responsável por despertar em mim o desejo de aprender e descobrir a natureza. Ainda hoje, me lembro da fabulosa frase “Vem ver Vi...” quando queria me mostrar fatos interessantes da vida cotidiana ou fenômenos naturais;

À Suellen de Oliveira Santos, minha esposa, por ser a pessoa mais próxima de mim em todas as conquistas e derrotas da vida. Obrigado por todo o carinho, amor, companheirismo e paciência. Obrigado por ser a pessoa que está sempre ao meu lado, cada vez mais bela, cada vez mais velha, cada vez mais linda, agora mais ainda, cada vez mais;

Ao meu irmão Joseílson Vasconcelos Gomes de Oliveira e sua esposa Sheila Patrícia Gomes da Cunha por sempre apoiarem nas horas mais necessárias;

Às minhas lindas sobrinhas Beatriz Vasconcelos Gomes da Cunha e Bianca Vasconcelos Gomes da Cunha por simplesmente existirem e fazer meus dias mais felizes;

À família Vasconcelos, minha origem pernambucana, em especial a Antonia Vasconcelos de Oliveira, José Nazário de Oliveira (*in memoriam*), Maria das Dôres Ferreira da Silva,

Josemilbson Vasconcelos de Oliveira, Patrícia Soraya Gomes de Brito, Luane Gomes Vasconcelos de Oliveira e Joseílbson Gomes Vasconcelos de Oliveira por ter me acolhido em seus braços durante toda minha formação acadêmica e profissional. Por sempre estar ao meu lado, me incentivando e me ajudando nas minhas caminhadas;

À família Gomes, minha origem baiana, em especial a Manoel Gomes da Silva, Oldemia de Oliveira Gomes (*in memoriam*), Maria das Graças Gomes de Oliveira Bezerra, Manoela Gomes de Oliveira Bezerra, Marcela Gomes de Oliveira Bezerra e Pedro Luiz Bezerra Gomes de Queiroz pela atenção, carinho e amor sempre presentes;

À minha sogra, Maria Luzineide de Oliveira Santos não só pela filha maravilhosa com quem casei e sou feliz. Isso já seria motivo suficiente para lhe estar grato, mas tenho que confessar, você acima de tudo é amiga e uma pessoa com bom coração;

A todos os amigos que perto ou longe contribuíram com seu apoio;

Ao amigo e professor Valdemiro Amaro da Silva Junior por ter me orientado e guiado nos trilhos da sabedoria. Obrigado por ser o professor que acompanho e admiro desde o 3º período do curso de Graduação em Medicina Veterinária. Obrigado por todas as verdadeiras orientações de estágio, iniciação científica, mestrado e doutorado. Obrigado por ser a pessoa que me emprestou livros para que eu pudesse obter vitórias profissionais e pessoais;

À equipe do Laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco em especial à Simone, Sandra, Paulo, André, Anna Kelly, Alluanan, Fabiana, Fernando, Jacilene, Jessica, Katharine e Alberes por todo o apoio e companheirismo sempre presente neste grupo de pesquisa;

À pesquisadora Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo por ter me acolhido em seu laboratório no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Obrigado pelas orientações, paciência e incentivo na condução deste trabalho;

À equipe do Laboratório de Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães em especial à Mary e Rafaela por toda a dedicação, empenho e colaboração na condução dos experimentos. Obrigado pelo apoio acadêmico e, principalmente, pela amizade de vocês;

À equipe do Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães em especial à Angela e Ralph por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À professora Ana Cristina Lima Leite do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e ao professor Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso da Universidade de Pernambuco não só pelo fornecimento dos compostos tiazólicos, mas também por toda a orientação para a condução deste trabalho;

Ao professor Leucio Câmara Alves, com incentivo e orientação qualificada, vem contribuindo na minha formação profissional com conselhos, críticas e sugestões. Obrigado a toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco;

Ao professor Sebastião Rogerio de Freitas Silva do Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória – UFPE pela amizade profissional e pessoal. Obrigado a toda equipe do Biotério do Centro Acadêmico de Vitória em especial a Leonildo e Rogério;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por terem contribuído para minha formação acadêmica;

Aos professores da Escola Pingo de Gente, Centro Educacional de Sobradinho e Colégio GEO por toda a fundamentação teórica e pessoal na minha formação enquanto cidadão;

A todos meus amigos da graduação, mestrado e doutorado com os quais convivi durante anos, passando por momentos felizes e tristes, aborrecimentos e boas conversas, mas sem nunca deixarmos de estarmos juntos. Todos vocês serão para sempre lembrados;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela possibilidade de realização deste curso;

À Fundação de apoio à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco pelo apoio financeiro;

Ao Centro Acadêmico de Vitória – UFPE, aos diretores da gestão atual e passadas, à chefia e a todo o quadro de servidores por incentivar à qualificação e por propiciar a redução da jornada de trabalho para o desenvolvimento do doutoramento;

À Uninassau, ao atual e antigo coordenador do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária e a todo o quadro de colaboradores por incentivar à qualificação;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.” (Jean de La Bruyère)

“Se eu soubesse antes o que sei agora, erraria tudo exatamente igual...”

(Humberto Gessinger)

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada pelo protozoário *Leishmania infantum* no Brasil. Os principais sítios de localização do parasito nos animais acometidos pela LV são os órgãos linfoides primários, secundários e tegumento. A principal via de transmissão decorre da ação hematófaga de vetores flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo. Todavia, outras formas de transmissão podem ser relacionadas, como as vias sexual, vertical, hematogena não vetorial e ainda existe a possibilidade de outros vetores estarem envolvidos na epidemiologia da doença. Os cães são de grande importância na manutenção do ciclo da doença e nas infecções humanas e o tratamento destes contra a LV torna-se importante para diminuição da prevalência da doença e melhoria da qualidade de vida destes animais. Diante disso, este estudo teve por objetivo avançar nos conhecimentos relacionados às vias alternativas de transmissão da LV em cães e nas propriedades biológicas dos tiazóis, investigando sua ação *in vitro* frente à *L. infantum*. Para tal, foi realizada revisão das principais formas de transmissão da LV em mamíferos, bem como análises moleculares por meio de qPCR e cPCR, seguido de sequenciamento de DNA de embrião canino proveniente de cadela naturalmente infectada por *L. infantum*. Para a avaliação do potencial leishmanicida, foram utilizados 10 compostos tiazólicos, sendo 5 tiazacetilpiridinas (TAPs-01; 04; 05; 06; 09) e 5 tiazopiridinas (TPs-01; 04; 05; 06; 09) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* além da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Análises ultraestruturais foram realizadas para identificar possíveis alvos intracelulares do composto mais eficaz sobre formas promastigotas. Para buscar rotas que esclareçam o possível mecanismo de ação dos compostos sobre as formas amastigotas intracelulares, foi realizada a dosagem de Nitrito. O teste de toxicidade oral aguda foi realizado conforme preconizado pela OECD-423. A revisão demonstra que outras vias de transmissão, e não somente a via vetorial, devem ser levadas em consideração na elaboração de políticas públicas de controle da LV, particularmente as vias vertical e sexual. Os resultados demonstram que a passagem de *L. infantum* de uma fêmea para o embrião pode ocorrer nos primeiros dias de prenhez. Com relação ao potencial leishmanicida, os compostos tiazólicos possuem promissora atividade leishmanicida com baixa toxicidade contra as células do hospedeiro e também é bem tolerado oralmente pelos animais. Considerando os resultados encontrados no presente estudo, pode-se evidenciar a transmissão vertical precoce de *L. infantum* em cães, bem como foi possível demonstrar que derivados tiazólicos possuem promissora atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania* sp., embrião, leishmanicida, citotoxicidade, OECD.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (LV) is a chronic disease caused by the protozoan *Leishmania infantum* in Brazil. The major sites of parasite localization in infected animals are the secondary lymphoid organs, bone marrow and cutaneous tissue. The main route of transmission is through the hematophagous action of phlebotomine vectors that belong to the genera *Lutzomyia* in the New World. However, other forms of transmission may be related, such as the sexual, vertical, non-vector hematogenous pathways, and there is still the possibility that other vectors may be involved in the epidemiology of the disease. Dogs are of great importance in maintaining the disease cycle and in human infections and treating them against LV becomes important to reduce the prevalence of the disease and also to improve the quality of life of these animals. The goal of this study was to advance the research related to the alternative pathways of LV transmission in dogs and on the biological properties of thiazoles, investigating their *in vitro* action against *L. infantum*. For this, a review of the main forms of LV transmission in mammals was carried out, as well as molecular analyzes by qPCR and cPCR, followed by the sequencing of canine embryo DNA from a naturally infected female dog by *L. infantum*. For the evaluation of leishmanicide potential, 10 thiazol compounds were used, 5 thiazoacetylpyridines (TAPs-01; 04; 05; 06; 09) and 5 thiazopyridines (TPs-01; 04; 05; 06; 09) on promastigotes and amastigotes of *L. infantum* in addition to the evaluation cytotoxicity in peritoneal macrophages of BALB/c mice. Ultrastructural analyzes were performed to identify possible intracellular targets of the most effective compound on promastigote forms. In order to observe routes that can clarify the possible mechanism of action of the compounds on the intracellular amastigote forms, the Nitrite dosage was performed. The acute oral toxicity test was performed as recommended by OECD-423. The review demonstrates that other ways of transmission should be taken into consideration in the elaboration of public LV control policies, particularly the vertical and sexual pathways. The results demonstrate that the transmission of *L. infantum* from a female canine to its embryo can occur in the first days of pregnancy. Regarding the leishmanicidal potential, thiazole compounds have promising leishmanicidal activity with low toxicity against host cells and are also well tolerated orally by animals. Considering the results found in the present study, it was possible to observe the early vertical transmission of *L. infantum* in dogs, and also to demonstrate that thiazole derivatives have promising leishmanicidal activity.

Key words: *Leishmania* sp., embryo, leishmanicide, cytotoxicity, OECD.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. (A) Promastigota e (B) Amastigota.....	22
Figura 2 - Representação da estrutura genérica de tiosemicarbazonas.....	28
Figura 3 - Representação da estrutura genérica da piridina.....	29
Figura 4 - Representação da estrutura genérica de tiazóis.....	29
Figura 5 - Obtenção dos compostos das séries TP e TAP.....	31

Capítulo III

Figura 1 - Procedimentos sintéticos para tiosemicarbazonas (2a-b) e 2-(piridin-2-il)1,3-tiazól (TPs e TAPs). Reagentes e condições: (a) tiosemicarbazida, 2-propanol, ácido acético(3 gotas), irradiação ultra-sônica, r.t., 120 min; (B) 2-bromoacetofenonas substituídas, 2-propanol, CaCO ₃ , irradiação ultra-sônica, r.t., 60 min.....	93
Figura 2 - Índice de sobrevivência (ISo) de <i>L. infantum</i> dentro de macrófagos após 24 horas de tratamento com os compostos TAP-01, TAP-04 e TAP-06.....	94
Figura 3 - Efeitos dos compostos sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	95
Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	96
Figura 5 - Dosagem de Nitrito presente no sobrenadante das culturas infectadas tratadas ou não com os compostos TAP-01, TAP-04 e TAP-06.....	97

Capítulo IV

Figura 1 - Estrutura química de N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina.....	121
Figura 2 - Etapas para o procedimento da toxicidade aguda, iniciando pela dose de 300mg/kg e usando 3 fêmeas por etapa, de acordo com o método “Toxicidade Aguda de Classe” baseado no Guia da OECD 423, 2001.....	122
Figura 3 - Alterações estruturais encontradas em fígados de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.....	123

Figura 4 - Alterações estruturais encontradas em rins de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.....	124
--	-----

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento da LV em cães.....	25
---	----

Capítulo III

Tabela 1 - Efeito dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i> e sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	92
---	----

Capítulo IV

Tabela 1 - Média do peso corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de fêmeas de hamster sírio oralmente expostos à TAP-04 nas doses de 300 e 2000 mg/kg.....	117
Tabela 2 - Valores das dosagens séricas de AST, ALT, FA, ureia, creatinina e albumina em hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e valores de referência descritos na literatura.....	118
Tabela 3 - Intensidade das alterações estruturais encontradas em fígado de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.....	119
Tabela 4. Intensidade das alterações estruturais encontradas em rins de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-AP	3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais
cPCR	Reação em cadeia de polimerase convencional
DL ₅₀	Dose única, calculada estatisticamente, de uma substância que pode ser esperada para causar a morte em 50% dos animais
FA	Fosfatase alcalina
GP63	Glicoproteína 63
HE	Hematoxilina e Eosina
IC ₅₀ /ama	Concentração capaz de inibir em 50% a infecção dos macrófagos por formas amastigotas
IC ₅₀ /pro	Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos
IFAT	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucinas
ISe	Índice de seletividade
ISo	Índice de sobrevivência
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADP	Nucleotídeo piridina prostético
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RR	Ribonucleotídeo redutase
SFB	Soro fetal Bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TAC	Toxicidade Aguda de Classe

TAP	Tiazoacetilpiridina
TCC	<i>T. cruzi</i> Cruzipain
TDF	Teste da Dose Fixa
Th1	T-cell helper 1
<i>TH2</i>	T-cell helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TP	Tiazopiridina
TUD	Teste “Up and Down”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 EPIDEMIOLOGIA	19
3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	19
3.3 IMUNOPATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES	20
3.4 MORFOLOGIA	21
3.5 BIOLOGIA CELULAR DE <i>Leishmania</i> sp.	22
3.6 TRATAMENTO DA LV EM CÃES	24
3.7 ALVOS TERAPÊUTICOS PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	26
3.8 TIOSSEMICARBAZONAS	27
3.9 PIRIDINAS	28
3.10 TIAZÓIS	29
3.11 TIAZOPIRIDINA (TP) E TIAZOACETILPIRIDINA (TAP)	30
3.12 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA	31
3.13 GUIA 423 DA OECD - MÉTODO DA TOXICIDADE AGUDA DE CLASSE (TAC)	33
CAPÍTULO I: TRANSMISSION ROUTES OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN MAMMALS	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
CONCLUSÃO	56
CAPÍTULO II: MOLECULAR EVIDENCE OF EARLY VERTICAL TRANSMISSION OF <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> IN A DOG	67
RESUMO	68
ABSTRACT	69
CAPÍTULO III: ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE TIAZÓIS SOBRE <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	77
RESUMO	78
1 INTRODUÇÃO	80
2 MATERIAL E MÉTODOS	81

2.1 DERIVADOS TIAZÓLICOS	81
2.2 PARASITOS	81
2.3 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULA DE MAMÍFERO.....	81
2.4 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	82
2.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS	82
2.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	82
2.7 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	83
2.8 ANÁLISE DOS DADOS	83
3 RESULTADOS	84
3.1 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C	84
3.2 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> .84	
3.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i>	84
3.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	85
3.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A PRODUÇÃO DE NO	86
4 DISCUSSÃO	87
5 CONCLUSÃO.....	91
CAPÍTULO IV: ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO DERIVADO TIAZÓLICO N-(1-METIL-2-METIL-PIRIDINA)-N'-(P-BROMOFENILTIAZOL-2- IL)-HIDRAZINA EM HAMSTER SÍRIO	102
RESUMO.....	103
ABSTRACT	104
1 INTRODUÇÃO	105
2 MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1 DERIVADO TIAZÓLICO	107
2.2 ANIMAIS	107
2.3 ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA	107
2.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	108
2.5 HISTOPATOLOGIA	108
3 RESULTADOS	110
4 DISCUSSÃO	112
5 CONCLUSÃO.....	116
CONCLUSÕES GERAIS	131

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) acomete diversas espécies de mamíferos silvestres, o cão e o homem, sendo ocasionada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (SHAW, 1994) no Brasil. Neste país, a LV tem-se expandido e atualmente encontra-se urbanizada e distribuída, principalmente, entre os estados do Nordeste (ALBUQUERQUE et al., 2009).

O cão doméstico é o principal reservatório da LV em áreas urbanas (DINIZ et al., 2008), onde a transmissão se dá pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília *Phlebotominae*, particularmente, a espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004). Todavia, a transmissão da LV em cães na ausência de vetor invertebrado tem sido relatada (OLIVEIRA et al., 2015).

Em humanos, a transmissão vertical (LOW & COOKE, 1926) e sexual (SYMMERS, 1960) está documentada, porém os mecanismos responsáveis por estas formas de transmissão não estão muito bem descritos.

Nos cães, existe na literatura relatos de transmissão sexual (SILVA et al., 2009), transmissão vertical (NAUCKE & LORENTZ, 2012), por transfusão sanguínea (DE FREITAS et al., 2006), além da possibilidade de novos vetores, como pulgas e carrapatos, estarem envolvidos na epidemiologia da doença (MORAIS et al, 2013).

Na literatura científica, o hamster (*Mesocricetus auratus*) tem sido o modelo mais adequado para a infecção experimental da LV, pois mimetiza a patogenia e os sinais clínicos da doença humana e canina (OLIVEIRA, 2006). Além disso, a classificação placentária dos humanos e do hamster é do tipo hemocorial, o que reforça este animal como um bom modelo biológico para estudo da transmissão transplacentária da doença.

Com relação ao tratamento, estudos realizados demonstram que na maior parte dos casos, nos animais infectados e tratados ocorre a cura clínica, no entanto, estes permanecem como reservatórios do parasito (IKEDA-GARCIA et al., 2007; MIRÓ et al., 2008). O tratamento da LV em animais tem objetividade de remissão dos sinais clínicos e redução na capacidade infectante dos animais (CIARLINI et al., 2010). Os fármacos de eleição na Europa para o tratamento da doença são antimoniato de meglumina, alopurinol, anfotericina B e a utilização de imunomoduladores (MIRÓ et al., 2005).

Nos últimos anos, diversas hidrazonas, tiosemicarbazonas, semicarbazonas e tiazolinonas foram sintetizadas e avaliadas *in vitro*, como inibidoras da enzima cruzaina ou TCC (*T. cruzi* Cruzipain), uma cisteíno-protease, dos quais 24 tiosemicarbazonas foram

hábéis em inibir a enzima em concentrações nanomolares. A maioria destes apresentou ação protetora em macrófagos frente à infecção com culturas de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (DU et al., 2002).

O desenvolvimento destas novas classes de agentes antiprotozoários via inibição das cisteíno-proteases dos parasitos constitui um importante avanço nas pesquisas de inovação terapêutica para as doenças tropicais negligenciadas, visto que:

- As cisteíno-proteases dos parasitos são alvos terapêuticos validados, pois possuem importância crucial na replicação e diferenciação celular e são expressas em mais de uma forma evolutiva do parasito (UEDA-NAKAMURA et al., 2001);

- São encontradas em *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *Trypanosoma* spp., e portanto, são alvos farmacológicos atrativos para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias de amplo espectro (LEITE et al., 2006);

Este perfil de atividades promissoras possibilita avaliar esses compostos frente ao gênero *Leishmania*.

Desta forma, objetivou-se avançar nos conhecimentos relacionados às vias alternativas de transmissão da leishmaniose visceral em cães e nas propriedades leishmanicidas dos tiazóis em *Leishmania infantum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avançar nos conhecimentos relacionados às vias alternativas de transmissão da leishmaniose visceral em cães e nas propriedades leishmanicidas dos tiazóis em *Leishmania infantum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar as principais formas de transmissão da leishmaniose visceral em mamíferos;
- Fornecer evidência molecular da transmissão vertical de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião nos estágios iniciais da prenhez;
- Avaliar o efeito dos compostos tiazólicos sobre o crescimento de promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar os efeitos dos compostos tiazólicos sobre o índice de infecção e sobrevivência de amastigotas de *L. infantum* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Analisar a citotoxicidade dos compostos sobre células de mamíferos;
- Correlacionar a citotoxicidade / atividade leishmanicida dos compostos tiazólicos através do índice de seletividade;
- Compreender o efeito imunomodulador dos compostos tiazólicos;
- Avaliar através da microscopia eletrônica de transmissão e varredura as alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com os compostos;
- Determinar a toxicidade oral aguda do composto TAP-04 em hamster sírio;
- Analisar parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal de hamsters sírios após exposição à TAP-04;
- Avaliar as alterações estruturais em fígado e rins de hamsters sírios após exposição à TAP-04.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (DAWIT et al., 2013), que são divididos em duas categorias, a saber: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (CHAPPUIS et al., 2007; HEUSSER JÚNIOR et al., 2010).

A forma cutânea da doença é descrita nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção de Chile e Uruguai. No Brasil, sete espécies são reconhecidas, sendo as mais importantes a *Leishmania (Vianna) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As regiões Norte e Nordeste foram responsáveis pela maioria dos diagnósticos registrados de casos humanos, sendo estes associados com infecção em cães (DANTAS-TORRES, 2007; PITTNER et al., 2009).

A LV, causada por *L. infantum*, por sua vez, é uma doença de evolução crônica e, na América Latina, tem sido relatada em pelo menos 12 países, com 90% dos casos da doença no continente concentrados no Brasil (CHAPPUIS et al., 2007, MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Cães infectados são considerados os principais reservatórios da doença em áreas urbanas e possuem grande capacidade de transmitir o parasito ao vetor (RODRIGUES et al., 2007).

A falta de saneamento e infraestrutura adequados, associada à simultânea interação e mobilização de reservatórios silvestres e cães, acarretaram em aumento do número de casos humanos e um elevado número de cães infectados em vários estados do Brasil. Devido a estes fatores, a doença, no Brasil, é considerada urbanizada (COLOMBO et al., 2011).

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

A LV é causada no Brasil por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (COLOMBO et al., 2011; LIMA et al., 2010), espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO et al., 2000), a qual se encontra inserida no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000; FEITOSA, 2001), sendo transmitido para os hospedeiros suscetíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

Apesar da via clássica de transmissão do parasito ser a vetorial, rotas alternativas de transmissão foram descritas tanto em cães, como no homem (TURCHETTI et al., 2014). Nos cães, existem relatos de transmissão sexual, transmissão vertical, por transfusão sanguínea, além da possibilidade de outros vetores, como pulgas e carrapatos, estarem envolvidos na epidemiologia da doença (OLIVEIRA et al., 2015).

3.3 IMUNOPATOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES

A presença de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imunológica do hospedeiro e evolução da doença. Cães suscetíveis têm lesões mais exacerbadas devido à tendência para uma resposta do tipo Th2, proliferação de linfócitos B e desencadeamento de resposta humoral. Por outro lado, a resistência à LV está relacionada com a ativação de células Th1 (BARBIÉRI, 2006).

Após infecção, os animais resistentes irão promover ativação de células TCD4⁺ Th1 com produção de IFN- γ , TNF- α e interleucinas (IL) 2 e 12, ativando macrófagos que destruirão as formas amastigotas intracelulares. Há fortes evidências que células TCD8⁺ citotóxicas também estão envolvidas na resistência à doença (PINELLI et al., 1995).

Por outro lado, em animais que desenvolvem sinais clínicos, há uma diminuição de células TCD4⁺ Th1 e aumento de TCD4⁺ Th2, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, promovendo proliferação de células B e consequentemente, produção de grande quantidade de anticorpos (PINELLI et al., 1994). A produção exacerbada de anticorpos não é efetiva, pois formam imunocomplexos que se depositam nas membranas basais de diversos órgãos (SLAPPENDEL, 1988; MARTINEZ-MORENO et al., 1995). Desta forma, as citocinas produzidas pelas células Th, a depender da resposta imunológica do hospedeiro, poderão ativar mecanismos que resultam tanto em resposta imunológica protetora, quanto na exacerbação da doença (PINELLI et al., 1999).

As infecções por *L. infantum* são caracterizadas por três características patogênicas principais, sendo a primeira determinada pela capacidade do parasito de inibir a atividade microbicida dos macrófagos, fazendo destes o seu sítio de replicação. Segundo, o estabelecimento e evolução da doença dependem da resposta imunológica do hospedeiro. Por último, uma vez estabelecida, a infecção persiste nos tecidos, principalmente nos que possuem maior concentração de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (PALTRINIERI et al., 2010).

Além da presença do protozoário nos tecidos, a deposição de imunocomplexos em alguns locais é importante para o desenvolvimento da patogenia da doença, particularmente nas paredes dos vasos sanguíneos, olhos, rins, e articulações (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

A LV em cães caracteriza-se pela grande variedade de sinais clínicos, relacionados basicamente a fatores individuais associados ao tipo de resposta imunológica desenvolvida, grau de infecção, tempo de evolução da doença e órgãos acometidos (EZQUERRA, 2001; MARCONDES et al., 2011). De acordo com os sinais clínicos observados, os animais podem ser classificados em assintomáticos ou sintomáticos (BLAVIER et al., 2001) sendo que os assintomáticos representam importante papel como reservatório da doença (BARBIÉRI, 2006).

Os principais sinais clínicos observados nos cães acometidos pela LV são linfadenomegalia, dermatopatias (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), hepatoesplenomegalia, onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007) e oftalmopatias (BRITO et al., 2006). No entanto, formas amastigotas de *Leishmania* sp podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães (TAFURI et al., 2004), o que pode resultar em manifestações clínicas atípicas (SOUZA et al., 2005).

Dentre os quadros atípicos, incluem-se desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001), nefropatias (COSTA et al., 2003), cardiopatias e pneumopatias (TORRENT et al., 2005), bem como envolvimento do sistema genital de cães machos (OLIVEIRA et al., 2016a) e fêmeas (OLIVEIRA et al., 2016b).

3.4 MORFOLOGIA

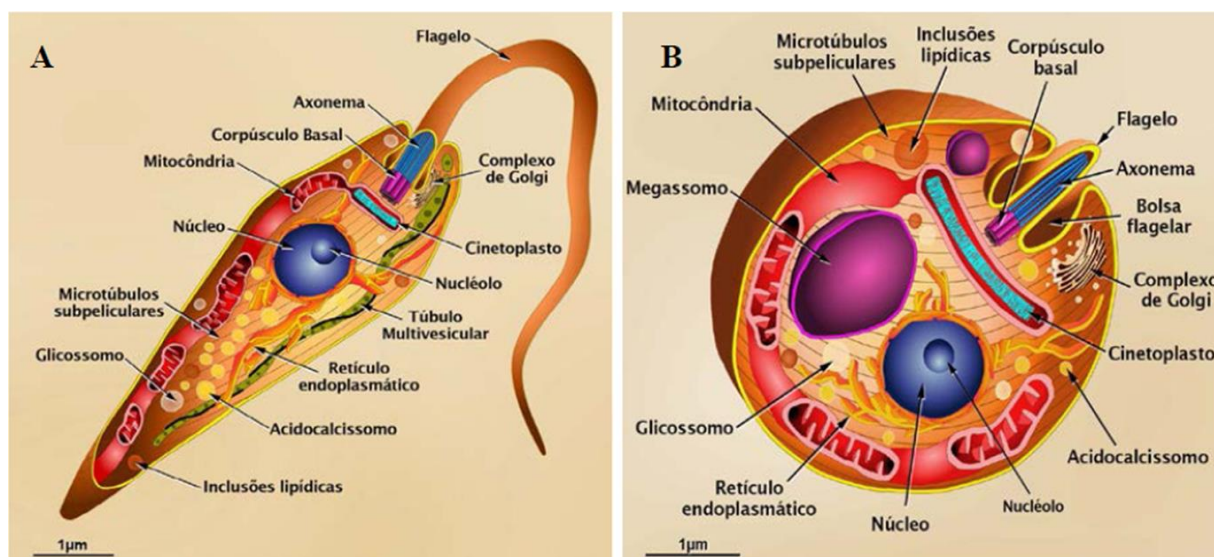
Os protozoários do gênero *Leishmania* são digenéticos (alternam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados), unicelulares e parasitos intracelulares obrigatórios do SFM. A forma promastigota é encontrada no hospedeiro invertebrado e a forma amastigota, encontrada no vacúolo parasitóforo dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (TANAKA et al., 2007).

As formas promastigotas colonizam o trato digestório e saliva do inseto vetor, apresentando um flagelo livre na extremidade anterior que emerge da bolsa flagelar. Estas multiplicam-se por divisão binária, são extracelulares e transmitidas ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do vetor hematófago (SACKS & KAMHAWI, 2001) (Figura

1A). Na região central é possível visualizar o núcleo arredondado ou oval e uma estrutura característica da ordem, o cinetoplasto em forma de bastão.

As formas amastigotas variam de arredondadas a ovoides, apresentando um flagelo reduzido, que está internalizado na bolsa flagelar (Figura 1B). Estas formas são intracelulares obrigatórias e estão presentes em vacúolos de células do SFM, principalmente nos macrófagos, onde irão sofrer multiplicação por divisão binária e romper a célula hospedeira para liberação de novas formas amastigotas, as quais estarão aptas a infectar outras células (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

Figura 1: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Promastigota e (B) Amastigota.



Fonte: TEIXEIRA, 2013.

3.5 BIOLOGIA CELULAR DE *Leishmania* sp.

As duas formas evolutivas apresentam estruturas que são específicas de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, como o cinetoplasto e o acidocalcissomo. Além de estruturas específicas, outras organelas comuns aos demais eucariotos como núcleo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi estão presentes (SOUZA, 2008).

O protozoário é revestido por uma membrana plasmática constituída de lipídios, ergosterol, carboidratos e proteínas. Algumas proteínas de superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (GP63) conferem proteção ao parasito contra a resposta imune do hospedeiro (SOUZA, 2008).

Sob a membrana plasmática, encontra-se um citoesqueleto, estrutura que confere rigidez e/ou flexibilidade ao corpo do parasito. Esta é composta por microtúbulos subpeliculares e actina (JAYANARAYAN e DEY, 2002).

Os tripanossomatídeos apresentam um flagelo único que emerge da bolsa flagelar localizada na região anterior das formas promastigotas e amastigotas. Esta estrutura tem função sensorial, de motilidade e fixação. A bolsa flagelar é o local onde ocorrem os processos de exocitose e endocitose da *Leishmania* sp. (SOUZA et al., 2009)

Ao contrário das células de mamíferos que possuem centenas a milhares de mitocôndrias, os tripanosomatídeos, entre os quais se incluem o *Trypanosoma cruzi* e as diversas espécies de *Leishmania*, possuem uma mitocôndria única (FIDALGO e GILLE, 2011). O bom funcionamento desta estrutura torna-se, desta forma, imprescindível para a sobrevivência dos parasitos (MEHTA e SHAHA, 2004). A ultraestrutura da mitocôndria nos tripanosomatídeos é bastante diversa em comparação aos organismos multicelulares, no que diz respeito à densidade da matriz bem como a forma e número de cristas. Geralmente, a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática, correndo todo o corpo do parasito abaixo dos microtúbulos subpeliculares. Uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem Kinetoplastida, é que o DNA mitocondrial (k-DNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada cinetoplasto (SOUZA et al., 2009). O cinetoplasto se situa próximo ao núcleo e sua forma e organização estrutural variam de acordo como o estágio de desenvolvimento do protozoário (SOUZA, 2008).

O núcleo é bem definido, com um cariossomo central, cromatina e nucléolo. É envolto por membranas que possuem poros nucleares e a membrana externa é contínua à membrana do retículo endoplasmático (SOUZA, 2008).

Além dessas estruturas, o protozoário possui outras que também são importantes para o seu ciclo. O complexo de Golgi, localizado próximo à bolsa flagelar, é responsável pelos processos de glicosilação e sulfatação. O retículo endoplasmático (liso e rugoso) presente em todo corpo celular e em grande parte próximo aos microtúbulos e mitocôndria, está envolvido na síntese de lipídeos e proteínas (DE SOUZA, 2002). Os acidocalcissomos são organelas ácidas que estocam cálcio, cátions e fósforo, atuando na manutenção da homeostase, pH e osmorregulação (DOCAMPO et al., 2005).

Os glicosomos são organelas delimitadas por membrana, presentes em grande quantidade em formas amastigotas e estão envolvidos em processos celulares, como metabolismo de peróxido, gliconeogênese e biossíntese de lipídeos (OPPERDOES & COOMBS, 2007).

Os megassomos são estruturas que tem atividade lisossomal, importantes para a sobrevivência das formas amastigotas no macrófago, sendo o destino final de todas as macromoléculas ingeridas pelo processo de endocitose do parasito (DE SOUZA et al., 2009).

3.6 TRATAMENTO DA LV EM CÃES

A quimioterapia atual contra a LV em cães foi desenvolvida há muitos anos, tendo como medicamentos de primeira linha os compostos antimoniais, miltefosina e alopurinol. Dentre as drogas de segunda linha, podem ser citados a domperidona, aminosidina (paromomicina), anfotericina B e pentamidina. No entanto, o tratamento é longo, tedioso e desagradável para cães e tutores. Além disso, os distúrbios renais são frequentemente associados tanto à doença como aos fármacos, o que pode exigir vigilância veterinária onerosa durante longos períodos de tempo (REGUERA et al., 2016). Desta forma, é evidente a necessidade de um novo tratamento mais seguros e eficaz contra as leishmanioses.

Na maioria dos casos, os medicamentos de primeira linha requerem administração parenteral por médico veterinário, não eliminam completamente a carga parasitária e apresentam muitos efeitos secundários tóxicos indesejáveis (MIRÓ et al., 2008; VALLADARES et al., 1998). Estes inconvenientes tornam difícil o uso de drogas de primeira linha em condições de campo, sendo extremamente frequente a aparição de recaídas (até 74%) no primeiro ano pós-tratamento (SLAPPENDEL e TESKE, 1997).

Além disso, os parasitos isolados de cães com recaída após tratamento farmacológico eram cinco vezes menos sensíveis a fármacos do que os parasitos isolados de cães não tratados (YASUR-LANDAU et al., 2016). Este fato, juntamente com uma dosagem errada e uma interrupção precoce do tratamento, pode aumentar a transmissão descontrolada para humanos e cães (REGUERA et al., 2016).

Apesar de seus muitos inconvenientes, a quimioterapia é o tratamento mais eficiente de cães infectados por *L. infantum* e tem benefícios em termos de redução da prevalência e incidência da doença, bem como no controle do ciclo de vida do parasito (MIRÓ et al., 2011). No entanto, uma vez que a eliminação completa do parasito não ocorre regularmente, os cães tratados devem ser monitorizados e mantidos sobre observação. O monitoramento de cães tratados é importante para alguns parâmetros, como carga parasitária e valores hematológicos e bioquímicos, especialmente ureia e creatinina, que servem para controlar a função renal (REGUERA et al., 2016).

Um aspecto relevante sobre o tratamento contra a LV em cães é o aparecimento de cepas resistentes a fármacos. A resistência pode ser uma consequência do uso indevido de drogas e pode ser desencadeada por fatores dos hospedeiros ou parasitários. Os fatores relacionados aos hospedeiros incluem modificações dos parâmetros farmacocinéticos ou uma alteração na resposta imunológica ao parasito. Os fatores relacionados ao parasito incluem modificações estruturais de proteínas alvo ou mecanismos de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro (RHALEM et al., 1999).

Alguns dos compostos quimioterápicos utilizados no tratamento da LV em cães estão incluídos na 19ª edição da Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da OMS (Abril de 2015) contra a leishmaniose: antimoniais pentavalentes, miltefosina, desoxicolato de anfotericina B ou formulados em formulações lipossômicas e paromomicina . No entanto, alguns outros fármacos também são eficazes, como alopurinol, pentamidina, enrofloxacina, marbofloxacina, metronidazol, espiramicina e cetoconazol (NOLI e AUXILIA, 2005). Os principais protocolos quimioterápicos atualmente utilizados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Protocolos quimioterápicos utilizados no tratamento da LV em cães.

Formulação terapêutica	Dose e via	Frequência	Duração	Referências
Antimoniato de meglumina	100 mg/kg iv, sc	q 8–24 h	3-4 semanas	Berman (1988)
Miltefosina	2 mg/kg vo	q 24 h	1 mês	Andrade et al., (2011)
Anfotericina B desoxicolato	0,5 mg/kg iv	Duas vezes por semana	2 meses	Oliva et al. (1995)
Antimoniato de meglumina + alopurinol	100 mg/kg sc; 10 mg/kg vo	q 24 h	2 meses; 1 ano	Koutinas et al. (2001)
Miltefosina + alopurinol	2 mg/kg vo; 10 mg/kg vo	q 24 h	1 mês; 1 ano	Miró et al., 2009
Alopurinol	20 mg/kg vo	q 12 h	Vitalícia	Saridomichelakis et al. (2005)
Domperidona	0,5 mg/kg vo	q 24 h	1 mês	Sabaté et al. (2014)

3.7 ALVOS TERAPÊUTICOS PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O controle e tratamento das leishmanioses devem ser metas prioritárias na saúde coletiva, pois tem sido observado o aumento do número de casos da doença (DESJEUX e ALVAR, 2003). Sendo assim, é necessário que sejam identificadas novas moléculas nos parasitos do gênero *Leishmania* para melhor compreender sua interação com os hospedeiros, e investigar a possibilidade do emprego destas moléculas como alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Seguindo este raciocínio, as proteases de parasitos têm sido bastante estudadas, pois participam da assimilação dos aminoácidos como fonte nutricional ou para síntese de substâncias orgânicas, da invasão ao hospedeiro, no metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos, na diferenciação e dos mecanismos de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, ou ainda, na resistência do parasito à terapia medicamentosa (MCKERROW et al., 2006). A análise do genoma de *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum* demonstrou que estas três espécies apresentam semelhante arranjo de proteases (BESTEIRO et al., 2007).

Considerando-se o papel essencial dessa classe de enzimas no ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*, algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas. Dentre estas, as cisteíno-proteases (UEDA-NAKAMURA et al., 2001), metaloproteases (JAFFE e DWYER, 2003) e serino-proteases (RHOADS e FETTERER, 1997) são exemplos de proteases amplamente estudadas.

As cisteíno-proteases são as enzimas proteolíticas mais investigadas em *Leishmania* ocorrendo em grandes quantidades em lisossomos, que são particularmente abundantes em formas amastigotas do parasito, mas podem ser encontradas em outros compartimentos intracelulares (UEDA-NAKAMURA et al., 2001). Estas enzimas desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do SFM do hospedeiro e a modulação de sua resposta imunológica (MOTTRAM et al., 2004; SELZER et al., 1999) constituindo assim atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses. Em contrapartida, a inibição destas enzimas por inibidores específicos em modelos murinos tem demonstrado grande toxicidade para as células de mamíferos. Além disso, é necessário um inibidor de cisteíno-protease com amplo espectro de ação, visto que existem três famílias de genes que codificam para pelo menos seis tipos de catepsinas diferentes de *Leishmania* e, a inibição de apenas um tipo de cisteíno-protease é insuficiente para bloquear a replicação do parasito (MOTTRAM et al., 2004, HIDE e BAÑULS, 2008).

Leishmanolisina, uma metaloprotease zinco-dependente, é uma das principais moléculas de superfície presente em todas as espécies de *Leishmania*, especialmente em formas promastigotas e tem como função facilitar a fixação do parasito ao macrófago (JAFFE e DWYER, 2003) e a ligação às células *natural killer* inibindo sua proliferação e facilitando assim a infecção parasitária (LIEKE et al., 2008). Observando-se esta característica, a possível utilização de inibidores desta enzima na formulação de vacinas tem sido realizados em camundongos, cães e macacos (JAAFARI et al., 2007; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007; OLOBO et al., 1995). Dentre estas espécies, apenas em camundongos foi conferida proteção efetiva contra a infecção (JAAFARI et al., 2007).

As serino-proteases são as enzimas mais estudadas da natureza e estão presentes em todos os organismos vivos. Tais proteases estão envolvidas numa grande diversidade de processos fisiológicos essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos (RAO et al., 1998) e em parasitos, de modo especial, estão envolvidas na degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, para facilitar sua invasão e disseminação; assimilação de aminoácidos, com consequente síntese de proteínas, peptídeos ou outros produtos derivados de aminoácidos e a reciclagem de proteínas; remodelagem do parasito durante a transição de um estágio morfológico para outro e ativação de enzimas ou de outras moléculas biologicamente ativas (RHOADS & FETTERER, 1997; ROSENTHAL, 1999).

A inibição de serino-proteases interfere na morfologia do parasito, causando importante deformação da bolsa flagelar e a formação de vesículas intracelulares podendo levar o parasito à morte (SILVA-LÓPEZ et al., 2007). Desta forma, a inibição das serino-proteases de *Leishmania* pode representar uma valiosa abordagem para o desenvolvimento racional de fármacos para o tratamento das Leishmanioses, produzindo drogas que possivelmente apresentem menos efeitos adversos para o hospedeiro e que tenham melhor índice terapêutico do que as drogas de uso corrente (SILVA-LÓPEZ, 2010).

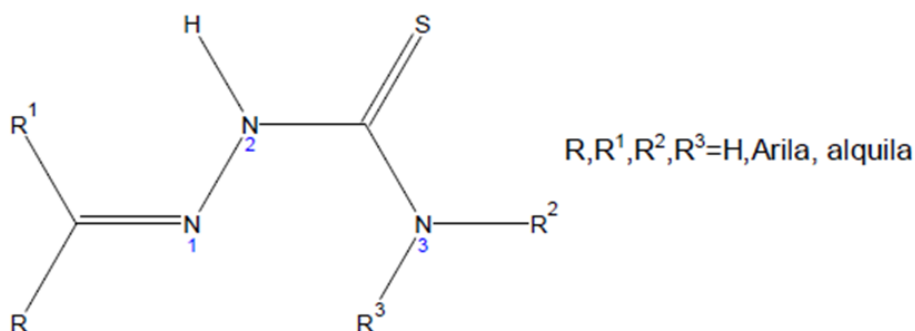
3.8 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (Figura 2) são compostos bases de Schiff, obtidos geralmente pela reação de condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (BERALDO e GAMBINO, 2004).

Estes compostos possuem uma ampla gama de aplicações farmacológicas (AGUIRRE et al., 2004) e foram identificados como possíveis protótipos a inibidores da cruzaina (FRICKER et al., 2008, GREENBAUM et al., 2004) com ação antiprotozoária (BHARTI et al., 2004). Em muitas circunstâncias, a ação farmacológica das tiossemicarbazonas é incrementada através da coordenação com íons metálicos (DA SILVA et al., 2009).

As tiossemicarbazonas apresentam mecanismo de ação complexo e podem atuar através da inibição de múltiplos alvos (GREENBAUM et al., 2004). Desta forma, tais compostos podem agir como inibidores enzimáticos, através da complexação com metais endógenos, bem como através de reações de redox ou ainda através de interações/inibição da síntese do DNA.

Figura 2: Representação da estrutura genérica de tiossemicarbazonas.



3.9 PIRIDINAS

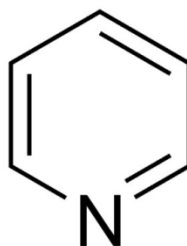
A piridina (Figura 3) é uma substância orgânica, com algumas características semelhantes ao benzeno e teve sua procura aumentada nas últimas décadas pela descoberta de muitos compostos bioativos contendo piridina por várias indústrias (SCRIVEN e BERRY, 2001). Este composto assumiu um importante papel na compreensão da química dos sistemas biológicos sendo, por sua vez, encontrado em muitas enzimas de organismos vivos como o nucleotídeo piridina prostético (NADP) (LI et al., 1999), que está envolvido em vários processos de oxidação – redução (FARHANULLAH et al., 2003).

A piridina também é encontrada em vitaminas como a niacina e piridoxina (vitamina B6) e também em alcaloides altamente tóxicos como a nicotina (JOULE et al., 1995). Na indústria farmacêutica, a piridina está presente em mais de 7000 núcleos de compostos bioativos (ROTH & KLEEMANN, 1988).

Entre os derivados piridínicos, a triapina (3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona, 3-AP) é um potente agente antitumoral dotado de boas características para a quelação com metais de transição. Como consequência da alta afinidade quelante de ferro, a triapina é um potente inibidor de enzimas contendo ferro tais como a ribonucleotídeo redutase (RR) e $P_{53}R_2$ (WADLER et al., 2004; SHAO, 2004). Considerava-se que a atividade inibitória da 3-AP era devido à remoção direta do Fe das enzimas, porém, evidências recentes sugerem que os efeitos redox do complexo 3-AP-Fe sobre essas enzimas também são importantes (CHASTON et al., 2003; SHAO et al., 2006).

O potencial terapêutico da condensação do anel piridínico (e seus análogos) com a tiossemicarbazona tem sido demonstrado em avaliações antiproliferativas (JANSSON et al., 2010; RICHARDSON et al., 2009) e atividade tripanocida (CARDOSO et al., 2014).

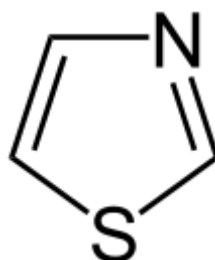
Figura 3: Representação esquemática da piridina.



3.10 TIAZÓIS

Os tiazóis são uma importante classe de compostos heterocíclicos que possuem átomos de nitrogênio e enxofre (Figura 4) e apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como atividades antitumoral (POPSAVIN et al., 2012), antibacteriana (LU et al., 2012), anti-inflamatória (SHAFI et al., 2012), antichagásico (NAVARRETE-VAZQUEZ et al., 2011) e leishmanicida (NAVA-ZUAZO et al., 2014).

Figura 4: Representação esquemática de tiazóis.



O núcleo tiazol está presente como subunidade em diversas moléculas biologicamente ativas, tais como sulfatiazol (ROTH e KLEEMANN, 1988), um importante fármaco antimicrobiano, o ritonavir (Norvir), medicamento utilizado no combate ao vírus HIV (SOUZA e ALMEIDA, 2003), epotilonas A e B, produtos naturais que possuem potente atividade antitumoral (KAMATH & JORDAN, 2003).

3.11 TIAZOPIRIDINA (TP) E TIAZOACETILPIRIDINA (TAP)

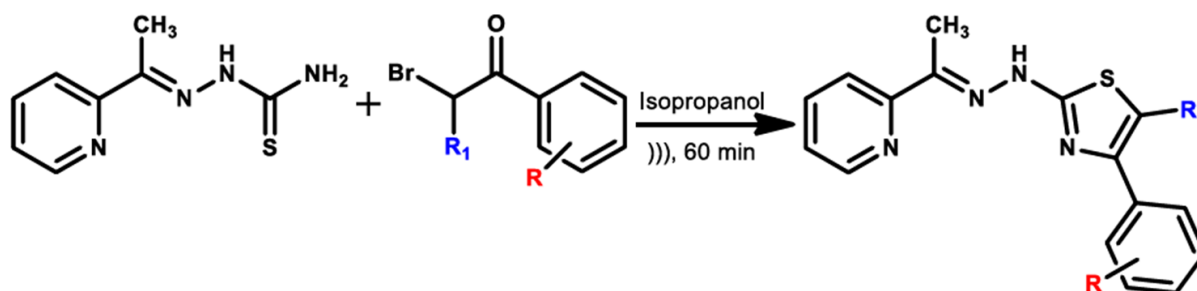
O grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) tem estudado novos fármacos antichagásicos mais ativos e menos citotóxicos que o benznidazol, utilizando as semicarbazonas e tiossemicarbazonas como núcleos de base. O resultado de tais esforços reflete-se com a conquista de ótimos resultados antichagásicos observados para estas classes químicas (LEITE et al., 2006; HERNANDES et al., 2010). Observa-se também que, a maior funcionalização desta classe apresenta melhores atividades através da ciclização da tiossemicarbazona em tiazol (CARDOSO et al., 2014).

Baseado nos resultados obtidos na ciclização da tiossemicarbazona em tiazol, a série dos tiazóis foi expandida, explorando o anel piridina para poder delimitar a importância de cada grupo funcional para a atividade tripanocida (CARDOSO et al., 2014). O núcleo piridina tem mostrado ser promissor devido ao amplo espectro de atividades biológicas concernentes (KEENAN et al., 2012; MENDES et al., 2007) e a alta capacidade de formar quelatos metálicos (PARRILHA et al., 2012).

Compostos detentores dos grupamentos piridina e tiossemicarbazona são amplamente estudados como fármacos antitumorais devido à propriedade quelante extremamente favorecida. Entretanto, a pesquisa das piridinas como agentes tripanocidas e leishmanicidas ainda é pouco explorada (CARDOSO et al., 2014).

A síntese dos compostos das séries TP e TAP utilizadas neste estudo está descrita por Cardoso et al. (2014) e resumida na figura 5.

Figura 5: Obtenção dos compostos das séries TP e TAP.



Composto	R1	R	Composto	R1	R
TP-01	H	H	TAP-01	H	CH ₃
TP-04	4-Br	H	TAP-04	4-Br	CH ₃
TP-05	4-F	H	TAP-05	4-F	CH ₃
TP-06	4-OMe	H	TAP-06	4-OMe	CH ₃
TP-09	3,4-Cl	H	TAP-09	3,4-Cl	CH ₃

Fonte: CARDOSO ET AL., (2014).

3.12 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade é um parâmetro necessário de qualquer estudo *in vivo* ou *in vitro* que atende aos objetivos de caracterizar os potenciais efeitos tóxicos dos componentes ativos de novos compostos, estimar o grau de perigo em uso e compreender o mecanismo de toxicidade induzida pela droga (PURCHASE et al, 1998). Esses estudos são realizados seguindo-se protocolos bem aceitos internacionalmente, ainda que, dentro do todo aprovado, as exigências legais variem de país a país (LAPA et al, 2003).

No estudo de toxicidade aguda, os animais são tratados uma única vez com o composto em teste ou, eventualmente, com doses parceladas em período não superior a 24 horas (LAPA et al, 2003). O teste permite avaliar vários parâmetros, a saber: o índice de letalidade; a forma de morte produzida pelo excesso dos compostos em teste e os órgãos alvo; as alterações comportamentais, as alterações hematológicas, bioquímica plasmática e urinária; fornece informações para avaliação dos riscos de exposição aguda ao composto; determina os valores de dose para estudos prolongados; indica as lesões dos órgãos afetados, e verificar os efeitos tardios do tratamento e se há reversibilidade da resposta tóxica (PURCHASE, et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO, et al., 2006; COECKE, et al., 2006) . Esse teste agudo é obrigatório para todos os tipos de materiais em teste, independente do tempo de uso

proposto, pois evidencia o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (KLAASSEN, 2007).

A DL_{50} é definida segundo a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) como sendo a dose única, calculada estatisticamente, de uma substância que pode ser esperada para causar a morte em 50% dos animais” (OECD, 1987). Em outras palavras, uma DL_{50} de um composto não é uma constante, mas sim um termo estatístico desenvolvido para descrever a resposta letal de um composto em uma determinada população em um discreto conjunto de condições experimentais (HAYES e DiPASQUALE, 2001).

O teste da DL_{50} foi inicialmente introduzido em 1927 para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos como a insulina (STAMMATI, et al., 2005). Na década de setenta, este teste começou a ser empregado amplamente como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias (GUBBELS-VAN HAL, et al., 2005). Para a realização deste teste, eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada, normalmente ratos e camundongos, e para cada substância testada (BOTHAM, 2004).

Em 1990 foi publicado o método que ficou conhecido como o Teste da Dose Fixa (TDF). O TDF utilizava um número menor de animais do que aquele preconizado pela OECD 401; causava menor mortalidade associada ao composto teste; além de menor dor e sofrimento aos animais (OECD, 2001a).

Em 1996, surgiu uma segunda alternativa a OECD 401, o método da Toxicidade Aguda de Classe (TAC), o qual foi adotado pela OECD (OECD 423) e, em 1998, surgiu o Teste “Up and Down” (TUD) sendo, também, posteriormente recomendado pela OECD (OECD 425). O Teste TAC também utiliza o conceito de dose fixas, porém o objetivo final seria a mortalidade. O TUD, como o nome sugere objetiva estimar o valor da DL_{50} testando sequencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (OECD, 2001b; OECD 2001c).

Contudo, o uso na prática destes 3 métodos alternativos não foi amplamente absorvido pela sociedade científica. Em países como o EUA e Japão, embora incorporadas às diretrizes e recomendadas, o uso destes métodos ficaram restritos a aquelas substâncias onde não era obrigado a obtenção do valor da DL_{50} , o intervalo de confiança e a inclinação da curva. Neste contexto, para facilitar a aceitação internacional dos 3 métodos e iniciar o processo de eliminação definitiva da diretriz OECD 401, a OECD organizou uma série de reuniões com especialistas no período de 1998 e 2000, o qual resultou na revisão das diretrizes 420, 423 e

425, além de um documento para o uso e interpretação de métodos alternativos de avaliação de toxicidade (VALADARES, 2006). Assim sendo, após muitos anos de controvérsias e debates, o teste da DL_{50} foi finalmente eliminado no final de 2002 (BOTHAM, 2004).

3.13 GUIA 423 DA OECD - MÉTODO DA TOXICIDADE AGUDA DE CLASSE (TAC)

O método *in vivo* é um procedimento gradual com a utilização de 3 animais do mesmo sexo por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou estado moribundo dos animais, em média, 2-4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. Este procedimento é reprodutível, utiliza muito poucos animais e é capaz de classificar substâncias de uma forma semelhante a outros métodos de testes de toxicidade aguda (Guia de Teste 420 e 425). O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica de doses fixas, devidamente separadas para permitir uma substância ser classificada quanto aos efeitos de classificação e avaliação de risco. O método, adotado em 1996, foi amplamente validado contra dados de DL_{50} obtidos na literatura (OECD, 2001b).

Três animais são usados para cada dose. A dose inicial deve ser selecionada entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, sendo aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxicidade evidente, quando possível, ou por meio de relatos evidenciados com base na estrutura química. Na ausência de ambas, a informação pode iniciar o estudo de triagem com a dose de 300 mg/kg (OECD, 2001b).

Quando informações avaliadas sugerem que a mortalidade significativa não seja iniciada com o valor maior de dose 2000 mg/kg de peso corpóreo, o teste para se conhecer o limite deve ser conduzido. Excepcionalmente, e somente quando justificado por necessidades específicas, o uso de um valor de dose maior de 5000 mg/kg pode ser considerada. O tempo de intervalo entre o tratamento dos grupos é determinado pelo início, duração e gravidade dos sinais tóxicos. O tratamento de animais com a próxima dose deve ser esperado até que se confirme a sobrevivência de um animal previamente doseado (OECD, 2001b).

Os animais são observados nos tempos de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 8 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Dependendo da mortalidade ou do estado moribundo dos animais outras doses são necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda da substância testada. A classificação da substância administrada é feita de acordo com o Globally Harmonised System, estimando-se sua DL_{50} (OECD, 2001b).

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 18, p.4885-4893, set. 2004.
- ALBUQUERQUE, A. R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região Metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v.71, p.78-80, jul. 2007.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 4, p. 330-333, out. 2009.
- ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p.83-90, set. 2011.
- ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal of Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000.
- BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sandflies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-487, ago. 2004.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p.329-337, jul. 2006.
- BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n.1, p.31-9, Jan. 2004.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p.560-586, mai. 1988.
- BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p.1063-1075, ago. 2007.

BHARTI, N. et al. Synthesis, characterization and in vitro anti-amoebic activity of new palladium(II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p.4679-4684, set. 2004.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, set. 2001.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in vitro**. v. 18, n.2, p.227-30, 2004.

BRITO, F. L. C. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n. 5, p.768-775, out. 2006.

CARDOSO, M. V. de O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p.48-59, out. 2014.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p.873-882, nov. 2007.

CHASTON, T. B. et al. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 1, p.402-414, jan. 2003.

CIARLINI, P. C. et al. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 369-375, 2010.

COECKE, S. et al. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals**. suppl 1, p. 147-175, 2005.

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, 11 jan. 2011.

COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p.677-684, nov.2003.

DA SILVA, J. G. et al. Increasing the antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-derived thiosemicarbazones. **Polyhedron**, v. 28, n. 11, p. 2301-2305, jul. 2009.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p.139-146, nov. 2007.

DAWIT, G. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 04, n. 02, p.1-7, 2013.

DE FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137, n. p.159-67, jul. 2006.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, n. 12, p.1013-1025, dez. 2002

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67-124, abr. 2009.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p.3-15, 2 out. 2003.

DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, fev. 2008.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p.251-261, mar. 2005.

DU, X. et al. Synthesis and Structure - Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p.2695-2707, jun. 2002.

EZQUERRA, L. P. A. **Las Leishmaniasis: La biologia al control**. Philadelphia: W.B. Saunders. (2. ed) 2001. Cap. 6, p. 157-159.

FARHANULLAH, F. et al. Synthesis of Aminonicotinonitriles and Diaminopyridines through Base-Catalyzed Ring Transformation of 2H-Pyran-2-ones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 7, p.2983-2985, abr. 2003.

FEITOSA, M. M. **Leishmaniose visceral: um desafio crescente**. São Paulo: Intervet pet, 2001. 15p.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n.11, p. 2758-2770, nov. 2011.

FRICKER, S. P. et al. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 10, p.1839-1845, out. 2008.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 12, p. 617-623, dez. 1996.

GREENBAUM, D. C. et al. Synthesis and Structure—Activity Relationships of Parasiticidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 12, p.3212-3219, jun. 2004.

GUBBELS-VAN HAL, W. M. et al. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 42, n. 3, p. 284-95, 2005.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal Of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p.167-176, mai. 2010.

HAYES, W. A.; DiPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritation. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p.7826-7835, nov. 2010.

HEUSSER JÚNIOR, A. et al. Leishmaniose tegumentar canina no município de Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p.713-718, dez. 2010.

HIDE, M.; BAÑULS, A. L. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p.105-106, fev. 2008.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p. 254-259, fev. 2007

JAAFARI, M. R. et al. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, v. 25, n. 32, p.6107-6117, ago. 2007.

JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. **Parasitology Research**, v. 91, n. 3, p.229-237, 1 out. 2003.

JANSSON, P. J. et al. Novel Thiosemicarbazones of the ApT and DpT Series and Their Copper Complexes: Identification of Pronounced Redox Activity and Characterization of Their Antitumor Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 15, p.5759-5769, 12 ago. 2010.

JAYANARAYAN, K. G.; DEY, C. S. Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 27, n. 5, p. 313-320, out. 2002.

JOULE, J. .; SMITH, G.; MILLS, K. **Heterocyclic chemistry**; 3rd ed.; Chapman and Hall: London, 1995; pp. 72–119.

KAMATH, K.; JORDAN, M. A. Suppression of microtubule dynamics by epothilone B is associated with mitotic arrest. **Cancer research**, v. 63, n. 18 , p.6026–6031, set. 2003.

KEENAN, M. et al. Analogues of Fenarimol Are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are Efficacious in a Murine Model of Chagas Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 9, p.4189-4204, maio 2012.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7. ed. Portugal: Mc Graw-Hill, 2007.

KOUTINAS, A. F. et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p.247-261, jul. 2001.

LAPA, J. A. et al Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C. M. O. ; SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

LEITE, A. C. et al. Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p.3749-3757, jun. 2006.

LI, A. t al. Synthesis, CoMFA Analysis, and Receptor Docking of 3,5-Diacyl-2,4-Dialkylpyridine Derivatives as Selective A₃ Adenosine Receptor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 4, p.706-721, fev. 1999.

LIEKE, T. et al. Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p.221-230, ago. 2008.

LIMA, V. M. F. et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p.330-333, out. 2010.

LOW, G. C.; COOKE, W. E. A congenital infection of kala azar. **Lancetii**, p.1209–1211, 1926.

LU, Xiaoyun et al. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.164-171, mar. 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p.2941-2947, dez. 2008.

MARCONDES, M. et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 175, n.1-2, p. 15-19, out. 2011.

MARTÍNEZ-MORENO, A. et al.. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 3-4, p.209-220, out. 1995.

MAURICIO I. L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p 188-189, mai. 2000.

MCKERROW, James H. et al. Proteases in parasitic diseases. Annual Review Of **Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.497-536, fev. 2006.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 12, p.798-813, dez. 2004.

MENDES, I. C. et al. Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity of pyridine-derived N(4)-tolyl thiosemicarbazones. **Polyhedron**, [s.l.], v. 26, n. 13, p.3263-3270, ago. 2007.

MIRÓ, G. et al. Miltefosine: A new treatment for canine leishmaniosis. Preliminary results. In: WORLDLEISH, 3., 2005, Palermo-Terrasini. **Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis**. Sicília: 2005. p. 171.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends In Parasitology**, v. 24, n. 8, p.371-377, ago. 2008.

MIRÓ, Guadalupe et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p.397-404, out. 2009.

MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p.52-52, jan. 2011.

MORAIS, R.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, v.59, n. 4, p.473–481, Abr. 2013.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion In Microbiology**, v. 7, n. 4, p.375-381, ago. 2004.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p.67, abr. 2012.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G. et al. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p.3168-3171, maio 2011.

NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p.1626-1633, mar. 2014.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 4, p.213-232, ago. 2005.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD 401**. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD 420**. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001a.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD 423**. Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001b.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD 425**. Acute Oral Toxicity -Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001c.

OLIVA, G. et al. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 36, n. 6, p.1013-1019, 1995.

OLIVEIRA, A. L. L. **Estudos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005**. 127p. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

OLIVEIRA, V. V. G. et al. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p.1622-1628, set. 2015.

OLIVEIRA, V. V. G. et al. Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**, v.46, n.4, p.641-647, abr. 2016a.

OLIVEIRA, V. V. G. et al. Correlation between chronic inflammation, immunostaining and parasite load in the genital system of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**, v.46, n.11, p.2029-2035, nov. 2016b.

OLOBO, J.O. et al. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (gp63). **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3-4, p.199-212, dez. 1995.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 4, p.149-158, abr. 2007.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, jun. 2010.

PARRILHA, G. L. et al. 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their antimony(III) complexes exhibit high anti-trypanosomal activity. **Polyhedron**, v. 31, n. 1, p.614-621, jan. 2012.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dog experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p.229-235, jan. 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum* – specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of immunology**, v.25, n. 6, p.1594-1600, jun. 1995.

PINELLI, E.; RUTETEN, P. M. G. V.; RUITENBERG E. J. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. In: **Canine Leishmaniasis:an update**. Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona, 1999, p.60-64.

PITTNER, E. et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar em cães de área endêmica no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p. 561–565, jun. 2009.

POPSAVIN, M. et al. Synthesis and in vitro antitumour screening of 2-(β -d-xylofuranosyl)thiazole-4-carboxamide and two novel tiazofurin analogues with substituted tetrahydrofurodioxol moiety as a sugar mimic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p.6700-6704, nov. 2012.

PRIETO, P. et al. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**, v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PURCHASE, I. et al. Workshop Overview: Scientific and Regulatory Challenges for the Reduction, Refinement, and Replacement of Animals in Toxicity Testing. **Toxicological Sciences**, v. 43, n. 2, p.86-101, jun. 1998.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p.597-635, set. 1998.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p.98-114, ago. 2016.

RHALEM, A. et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 1, p.69-76, out. 1999.

RHOADS, M. L.; FETTERER, R. H. Extracellular matrix: A tool for defining the extracorporeal function of parasite proteases. **Parasitology Today**, v. 13, n. 3, p.119-122, mar. 1997.

RICHARDSON, D. R. et al. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 5, p.1459-1470, 12 mar. 2009.

RODRIGUES, C. A. T. et al. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p.197-205, fev. 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPH, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p.7962-7971, nov. 2007.

ROSENTHAL, P. J. Proteases of Protozoan Parasites. **Advances In Parasitology**, v. 43, n. 1, p.105-159, fev. 1999.

ROTH, H. J.; KLEEMANN, A. **Pharmaceutical Chemistry: Drug Synthesis**; Europe, P. H., Ed.; 1st ed.; London, 1988; p. 407.

SABATÉ, D. et al. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 115, n. 1-2, p.56-63, jul. 2014.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p.453-483, out. 2001.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 3-4, p.199-205, jun. 2005.

SCRIVEN, E.; BERRY, D. **Speciality Chemicals Magazine**, v. 2001, n.1, 2001.

SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p.11015-11022, 28 set. 1999.

SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.324-333, mar. 2012.

SHAO, J. et al. A Ferrous-triapipe complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 3, p.586-592, 1 mar. 2006.

SHAO, J. In Vitro Characterization of Enzymatic Properties and Inhibition of the p53R2 Subunit of Human Ribonucleotide Reductase. **Cancer Research**, v. 64, n. 1, p.1-6, 1 jan. 2004.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471–478, Jul/set. 1994.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.55-59, mar. 2009.

SILVA-LOPEZ, R. E. et al. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p.1627-1635, ago. 2007.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n.7, p.1541-1548, jun. 2010.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniosis. A review baseado n 95 cases in Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n.1, p.1-16, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; TESKE, E.. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (glucantime ®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Veterinary Quarterly**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.10-13, mar. 1997.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 2009.

SOUZA, A.I. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 51–54, abr. 2005.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 366–372, set 2003.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, n.4, p.313-325, jun. 2008.

SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v.41, n.10, p.2069-2080, abr. 2009.

STAMMATI, A. et al. Thirteenth International Workshop on In Vitro Toxicology. **Toxicology in vitro**, v. 19, n.7, 843-844, 2005.

SYMMERS, W. S. C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet**, v. 275, n.7116, p.127-132, jan. 1960.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n.1-2, p. 17–23, set. 2004.

TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (L.) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 6, p. 799-806, abr. 2007.

TEIXEIRA, D.E. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1ª Ed. Rio de Janeiro. **Fundação CECIERJ**, Consórcio CEDERJ, 2013.

TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n.11, p. 549–552, 2005.

TURCHETTI, A. P. et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.403-407, abr. 2014.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, [s.l.], v.87, n.2, p.87-89, fev. 2001.

VALLADARES, J. et al. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 1, p.33-40, fev. 1998.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL 50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. **Current Pharmacology Design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, dez. 2002.

WADLER, S. et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of the Ribonucleotide Reductase Inhibitor, 3-Aminopyridine-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazone, Administered by 96-Hour Intravenous Continuous Infusion. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 9, p.1553-1563, 29 abr. 2004.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p.2-13, jan. 2016.

CAPÍTULO I:

TRANSMISSION ROUTES OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN MAMMALS

VIAS DE TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM MAMÍFEROS

Artigo publicado em:

Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.9, p.1622-1628, set, 2015

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141368>

ISSN 0103-8478

Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals

Vias de transmissão da leishmaniose visceral em mamíferos

Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira^{I*} Leucio Câmara Alves^{II} Valdemiro Amaro da Silva Junior^I

^(I) Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^(II) Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os principais sítios de localização do parasito nos animais acometidos pela LV foram órgãos linfoides primários, secundários e tegumento. Contudo, existem relatos da detecção do parasito em órgãos do sistema genital masculino e feminino. A principal via de transmissão decorre da ação hematófaga de vetores flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Todavia, outras formas de transmissão podem ser relacionadas, como as vias sexual, vertical, hematogena não vetorial e ainda existe a possibilidade de outros vetores estarem envolvidos na epidemiologia da doença. Dessa forma, a proposta deste artigo foi revisar as principais formas de transmissão da leishmaniose visceral em mamíferos.

Palavras-chave: *Leishmania* sp, cães, transmissão sexual, transmissão vertical.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic disease caused by *Leishmania infantum*. The major sites of parasite localization in infected animals are the secondary lymphoid organs, bone marrow and cutaneous tissue. However, reports exist on the detection of the parasite in the organs of the male and female genital system. The main route of transmission is related to the hematophagous sandfly vectors of the genus *Lutzomyia* (New World) and *Phlebotomus* (Old World). However, other routes of transmission may be mentioned, such as sexual, vertical, hematogenic without vector and others involved in VL epidemiology. Thus, the current article reviews the main forms of transmission of visceral leishmaniasis in mammals.

Keywords: *Leishmania* sp, dogs, sexual transmission, vertical transmission.

INTRODUÇÃO

A LV é uma importante zoonose parasitária que tem o cão doméstico como principal reservatório da doença, particularmente em áreas urbanas (DINIZ et al., 2008). Ela é ocasionada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sinonímia *L. chagasi*), o qual apresenta tropismo pelo sistema mononuclear fagocitário (NEVES, 2005; CHAPPUIS et al., 2007).

A doença é usualmente transmitida pela ação hematófaga de insetos vetores flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (MURRAY et al., 2005). Entretanto, rotas alternativas de transmissão foram descritas tanto em cães, como no homem (TURCHETTI et al., 2014). Nos cães, existem relatos de transmissão sexual (SILVA et al., 2009a), transmissão vertical (NAUCKE & LORENTZ, 2012), por transfusão sanguínea (DE FREITAS et al., 2006), além da possibilidade de outros vetores, como pulgas e carrapatos, estarem envolvidos na epidemiologia da doença (MORAIS et al., 2013).

As vias alternativas de infecção colocam à prova as estratégias de controle e erradicação da LV baseadas na eliminação do vetor, atestando que estas não seriam eficientes, pois *L. infantum* manteria seu ciclo, assumindo potencial importância no acasalamento de cães errantes positivos (SILVA et al., 2009a).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais prevalente que a infecção no homem, além de que, existe um grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (BONATES, 2003).

No cão, a infecção por *L. infantum* é considerada uma enfermidade crônica que acarreta o aparecimento de diversos sinais clínicos como linfadenomegalia, dermatopatias (SOLANO-GALLEG0 et al., 2009), hepatoesplenomegalia, onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2007) e oftalmopatias (BRITO et al., 2006). Além destas lesões clássicas, o parasito eventualmente provoca lesões no sistema genital tanto de cães machos (MIR et al., 2012) como de fêmeas (OLIVEIRA, 2013), podendo inclusive ser detectado no sêmen (DINIZ et al., 2005) e placenta (DUBEY et al., 2005), favorecendo desta forma as vias de transmissão sexual e vertical, respectivamente.

Desta forma, considerando a possibilidade de vias alternativas de transmissão da LV em mamíferos, serão abordadas nesta revisão as principais formas de transmissão da doença tendo em vista a importância epidemiológica para a manutenção do ciclo do parasito, particularmente em áreas livres de vetores.

Via clássica de transmissão da LV

L. infantum é um parasito difásico, com ciclo de vida heteroxeno, ou seja, que se completa em dois hospedeiros: o flebotomíneo vetor (*L. longipalpis* no novo mundo), que abriga o parasito na forma promastigota extracelular flagelada; e o hospedeiro mamífero, onde a forma amastigota intracelular se desenvolve (BARATA et al., 2004; TOMÁS & ROMÃO, 2008; SOLANO-GALLEG0 et al., 2009).

A transmissão da LV entre mamíferos acontece primariamente de forma indireta, necessitando da presença do vetor, que se infecta quando este realiza repasto sanguíneo num animal ou homem infectado, ingerindo as amastigotas de *L. infantum* presentes na derme (BARATA et al., 2004). Dentro do trato digestório do inseto, as amastigotas transformam-se em promastigotas entre 24 a 48 horas após a ingestão. No intestino do inseto, essas promastigotas reproduzem-se e migram para o esôfago e faringe. Durante o próximo repasto sanguíneo elas são regurgitadas e penetram na derme do hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006). A saliva do inseto *L. longipalpis* possui um potente peptídeo vasodilatador, denominado maxadilan, que é liberado na pele do hospedeiro, quando o inseto realiza o repasto sanguíneo, facilitando, desta forma, a infecção (LERNER et al., 1991; LERNER & SHOEMAKER, 1992).

Após o hospedeiro vertebrado ser infectado pelas promastigotas do parasito, estas são fagocitadas por macrófagos e transformam-se em amastigotas. Dentro dos macrófagos as amastigotas reproduzem-se, rompem os macrófagos, são liberadas no meio extracelular sendo novamente, fagocitadas por outros macrófagos (HANDMAN & BULLEN, 2002).

Transmissão sexual da LV

O primeiro relato de transmissão sexual da LV ocorreu no Reino Unido em um paciente humano. Neste estudo, numa área onde não havia vetor nem casos autóctones da doença, uma mulher, que nunca havia saído do país desenvolveu lesões genitais contendo amastigotas de *L. infantum*. Neste estudo, foi possível observar que a esposa infectou-se a partir do marido que havia contraído LV no Sudão 12 anos antes (SYMMERS, 1960).

Em cães, Riera e Valladares (1996) aventaram a possibilidade que a transmissão venérea ocorreria nesta espécie, pois conseguiram isolar *L. infantum* no sêmen destes animais. Neste estudo, três cães machos da raça Beagle foram experimentalmente inoculados com *L. infantum*. Após a infecção ser confirmada por métodos sorológicos, exame direto e cultura do aspirado de linfonodos, o sêmen foi coletado e cultivado em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle).

Além do isolamento de *L. infantum* no sêmen canino (RIERA & VALLADARES, 1996), vários outros estudos demonstram que o parasito tem tropismo pelo sistema genital masculino de cães (DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009; BENITES et al., 2011) desencadeando uma resposta imune local (BENITES et al., 2011) e favorecendo o aparecimento de *L. infantum* no sêmen destes animais (DINIZ et al., 2005).

Cães machos naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam ausência de alterações macroscópicas em órgãos do sistema genital, porém histologicamente possuem lesões (AMARA et al., 2009). Estas lesões são caracterizadas por reações inflamatórias crônicas em todos os órgãos deste sistema (OLIVEIRA, 2013), além de atrofia degenerativa do epitélio seminífero (PIZARRO et al., 1989; DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009), fibrose com adelgaçamento do epitélio epididimário (AMARA et al., 2009), prostatite (MIR et al., 2012) e azoospermia (DIAZ et al., 1982).

Além destas lesões nos órgãos genitais internos, amastigotas de *L. infantum* tem sido relatadas na glândula de cão com tumor venéreo transmissível (CATONE et al., 2003, MARINO et al., 2012) e prepúcio (DINIZ et al., 2005) desencadeando nestas áreas uma reação inflamatória com predomínio de macrófagos. Estes estudos reforçam a possibilidade da ocorrência da transmissão sexual da LV. Por outro lado, surge o questionamento se a transmissão da doença ocorre pelo sêmen contaminado ou pela transferência de amastigotas de *L. infantum* originadas da genitália externa do macho durante o momento da cópula sabidamente traumático na espécie canina (SILVA et al., 2009a).

Em cadelas, a dermatite vulvar foi a única lesão importante sugerindo que *L. infantum* não tem um tropismo para o sistema genital feminino de cães (SILVA et al., 2008). Por outro lado, outros estudos demonstraram que todos os órgãos do sistema genital feminino de cães

naturalmente infectados por *L. infantum*, à exceção dos ovários, apresentam lesões, havendo inclusive uma elevada carga parasitária em todos estes órgãos (ROSYAL et al., 2005; OLIVEIRA, 2013). Desta forma, o parasito tem tropismo por órgãos do sistema genital masculino (DINIZ et al., 2005) e feminino (OLIVEIRA, 2013) de cães.

Em condições experimentais de ausência de vetor biológico, cadelas livres de *L. infantum* copularam com cães naturalmente infectados resultando em 25% de cadelas sorologicamente positivas para *Leishmania* spp. e 50% positivas por PCR (Silva et al., 2009a). Silva et al. (2009a) sugeriram que a transmissão sexual era unidirecional apesar de não terem realizado o experimento no sentido inverso. No entanto, Rosypal & Lindsay (2005) demonstraram que em camundongos BALB/C, fêmeas experimentalmente infectadas com *L. infantum* e comprovadamente positivas por PCR e sorologia transmitiram a infecção a machos com os quais conviviam.

Transmissão vertical da LV

A transmissão vertical da LV em humanos foi relatada em crianças nascidas de mães infectadas em áreas endêmicas (LOW & COOKE, 1926; BLANC & ROBERT, 1984). Por outro lado, esta via de transmissão é teoricamente suportada nos cães pelo achado de *L. infantum* no útero gravídico (ROSYAL et al., 2005), fluidos e tecidos de fetos (CARACAPPA et al., 2000), trofoblasto placentário (DUBEY et al., 2005) e órgãos de filhotes nascidos de mães infectadas (PANGRAZIO et al., 2009).

O primeiro relato de transmissão vertical da LV em cães foi feito por Mancianti & Sozzi (1995) que isolaram *L. infantum* em amostras de fígado, baço e linfonodo de um recém-nascido proveniente de uma cadela infectada. No intuito de demonstrar esta via de transmissão, Andrade et al. (2002) utilizaram 63 filhotes provenientes de 18 cadelas com LV para detectar a presença do parasito por meio de exames parasitológico, histopatológico e PCR em amostras de baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Nenhum teste realizado nos filhotes foi positivo, não sendo possível, desta forma, confirmar a transmissão vertical da doença. Contudo, vários outros estudos mais recentes demonstram que este tipo de transmissão pode ocorrer na espécie canina (MASUCCI et al., 2003; DUBEY et al., 2005; ROSYPAL et al., 2005; GIBSON-CORLEY et al., 2008; PANGRAZIO et al., 2009; SILVA et al., 2009b; FREEMAN et al., 2010; BOGGIATTO et al., 2011; NAUCKE & LORENTZ, 2012).

A transmissibilidade de *L. infantum* a partir de mães infectadas para seus filhotes parece não ter correlação entre as condições clínicas das mães durante a prenhez. A infecção, nestes casos, raramente desencadeia o aparecimento de sinais clínicos no primeiro mês de

vida de cães (MASUCCI et al., 2003). A passagem do parasito da mãe para os filhotes durante a gestação pode ser por via transplacentária, uma vez que o DNA do parasito já foi detectado via PCR no útero gravídico (ROSYPAL et al., 2005), bem como, amastigotas de *L. infantum* já foram observadas em trofoblasto placentário (DUBEY et al., 2005).

Assim como filhotes nascidos de mães infectadas dificilmente apresentam sinais clínicos (MASUCCI et al., 2003), histologicamente também não são observadas lesões compatíveis com LV em órgãos de fetos caninos provenientes de mães infectadas (PANGRAZIO et al., 2009). Neste estudo, embora não tenha havido alterações estruturais em órgãos como fígado, baço, linfonodo, medula óssea, rins e coração, foi possível observar amastigotas do parasito em todos os órgãos, a exceção dos rins e coração (PANGRAZIO et al., 2009). Da mesma forma como descrito por Masucci et al. (2003), foi observado que não há diferença no potencial de transmissão da LV quando comparadas cadelas prenhes sintomáticas com assintomáticas, sendo possível observar também uma alta frequência de transmissão transplacentária (PANGRAZIO et al., 2009).

Por sua vez, outros relatos demonstraram a infecção por *L. infantum* em natimortos ou em recém-nascidos provenientes de cadelas naturalmente infectadas (GIBSON-CORLEY et al., 2008; FREEMAN et al., 2010; BOGGIATTO et al., 2011). Além disso, filhotes nascidos de cadelas naturalmente infectadas apresentam respostas proliferativas de células T CD4⁺ específicas para *L. infantum*, o que sugere uma resposta imunitária específica para o parasito (BOGGIATTO et al., 2011).

A resistência à leishmaniose está associada com uma intensa resposta do tipo Th1. Por outro lado, a imunossupressão é necessária para evitar reações imunitárias contra antígenos fetais durante a prenhez. Portanto, a alteração que ocorre naturalmente no padrão de resposta imunológica durante a prenhez do tipo Th1 para o tipo Th2 pode aumentar a severidade da doença na mãe, bem como o risco de transmissão vertical da LV (ROSYPAL et al., 2005).

A prevalência da LV entre cães da raça Foxhounds nos Estados Unidos é, talvez, a situação mais notável em que a transmissão sexual e vertical possivelmente desempenham um papel importante na manutenção da doença numa área não endêmica (PETERSEN, 2009). A LV é um problema emergente entre algumas raças de cães neste país, em particular no caso de cães desta raça, que tem uma prevalência estimada com base em PCR em tempo real, superior a 20% (BOGGIATTO et al., 2011). Esta situação ocorre em uma área onde não foi possível determinar se as espécies de flebotomíneo lá presentes são vetores biológicos competentes para *L. Infantum*. Portanto, elas não podem ser responsabilizadas pela manutenção da doença nesta raça em particular. Assim, a forma como *L. infantum* está sendo transmitida em cães nos

Estados Unidos é atualmente desconhecida, mas é provável que seja devido à transmissão sexual e vertical (PETERSEN & BARR, 2009).

Transmissão hematogena não vetorial

A transfusão sanguínea é uma prática comum e rotineira na medicina veterinária em casos de anemia e hemorragia (HOSGOOD, 1990). Assim, há um risco muito alto de transmissão de agentes infecciosos, particularmente protozoários, devido aos seus longos períodos de incubação, persistência subclínica em animais infectados e probabilidade de permanecerem viáveis em estoques sanguíneos (OWENS et al., 2001, TABAR et al., 2008).

Casos de transmissão da LV através de transfusão sanguínea foram documentados em cães, onde animais de diversas raças receberam sangue de doadores da raça English Foxhounds (OWENS et al., 2001). Neste estudo, os autores não aconselharam o uso de cães desta raça como doadores de sangue na América do Norte devido a uma alta prevalência da LV entre estes animais.

Na Espanha, Tabar et al. (2008) detectaram a presença de DNA de *L. infantum* via PCR em tempo real em 19,6% de amostras provenientes de um banco de sangue canino de uma área endêmica, demonstrando, desta forma que, a infecção por *L. infantum* é comum entre cães doadores de sangue nestas áreas. Além disso, hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com sangue e suspensão de monócitos provenientes de cães naturalmente infectados por *L. infantum* desenvolveram a infecção e os sinais clínicos 6 meses após a inoculação (DE FREITAS et al., 2006). Desta forma, estes resultados sugerem que os doadores de sangue devem ser monitorados de forma rigorosa e periodicamente para infecção por *L. infantum*, para evitar a disseminação da doença por meio de transfusão de sangue (DE FREITAS et al., 2006).

Transmissão por vetores alternativos

A capacidade vetorial de outros artrópodes pode ser favorecida pelas características epidemiológicas da LV que permitem a estreita associação dos ectoparasitos com os cães infectados (COUTINHO et al., 2005), reafirmando a teoria de Sherlock (1964), a qual indica que a transmissão poderia ser feita provavelmente por outros vetores, na ausência de flebotomíneo. Dentre estes possíveis vetores alternativos, destacam-se o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis* (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO & LINARDI, 2007; MORAIS et al., 2013).

A hipótese de transmissão da LV em cães por carrapatos foi estudada na França no início do século XX, onde Blanc e Caminopteros (1930) infectaram experimentalmente *R. sanguineus*, os quais foram capazes de manter *L. infantum* viáveis. Por outro lado, nos EUA,

foi demonstrado que tais carrapatos, em condições experimentais, podem ingerir *L. infantum* alimentando-se normalmente em um cão infectado. As amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo podem evoluir para promastigotas e sobreviver durante várias semanas no intestino deste ectoparasito (MCKENZIE, 1984).

No Brasil, a infectividade de *L. infantum* encontrada nos carrapatos foi comprovada por meio de inoculação experimental de macerados de carrapatos positivos em hamsters (*M. auratus*) (COUTINHO et al., 2005).

Mais recentemente foi detectado kDNA em glândula salivar de *R. sanguineus* coletados de cães soropositivos para *Leishmania* sp (DANTAS-TORRES et al., 2010a). Além disso, o DNA do parasito já foi encontrado em cães e em carrapatos que estavam parasitando estes animais (MORAIS et al, 2013). Estes resultados, porém, não comprovam a capacidade vetorial desta espécie, uma vez que ainda não foi comprovada a manutenção do ciclo epidemiológico do parasito e a transmissibilidade para os cães. Por outro lado, Dantas-Torres et al. (2010b) infectaram teleóginas de *R. sanguineus* com promastigotas de *L. infantum* e os ovos e larvas destas fêmeas foram positivas por PCR, indicando que o parasito se mantém no carrapato em diferentes fases.

A pulga da espécie *C. felis felis* também tem sido alvo de pesquisas devido à sua provável participação na epidemiologia da LV (COUTINHO & LINARDI, 2007, FERREIRA et al., 2009), porém com menos fundamento científico que o carrapato. Nestes dois estudos, pulgas colhidas de cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram maceradas e inoculadas por via intraperitoneal ou oral em hamsters (*M. auratus*). Em ambos os estudos, os hamsters se tornaram positivos em exames moleculares e sorológicos. Por outro lado, a possibilidade de transmissão oral de *L. infantum* por pulgas não pode ser comprovada devido à possibilidade de reações cruzadas entre as espécies de *Leishmania* e *Leptomonas* nos testes utilizados (PCR e Reação de Imunofluorescência Indireta) (COUTINHO & LINARDI, 2007).

CONCLUSÃO

Embora até o presente momento as políticas públicas de controle levem em consideração apenas a transmissão da LV por flebotomíneos, outras vias podem ter importância epidemiológica, particularmente em áreas livres de vetores biológicos. Dentre os modos de transmissão pesquisados atualmente, destacam-se a via sexual e a via vertical. Outros vetores biológicos como ectoparasitos de cães ainda necessitam de confirmação quanto ao papel que desempenham no ciclo de propagação da doença. Quanto à transfusão

sanguínea, faz-se necessário rigoroso monitoramento de cães doadores de sangue para prevenir a infecção por *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A.R. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região Metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v.71, p.78-80, 2007. Available from: <<http://www.revistaclinicaveterinaria.com.br/edicao/2007/novembro-dezembro.html>>. Accessed: Ago. 16, 2014.
- AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.160, n.1, p.54-60, 2009. Available from: <http://www.revmedvet.com/2009/RMV160_54_60.pdf>. Accessed: Ago. 16, 2014.
- ANDRADE, H.M. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.71-81, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005520>>. Accessed: Ago. 16, 2014. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00552-0.
- BARATA, R.A. et al. *Phlebotomine sandflies* in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.5, p.481-487, 2004. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762004000500004&script=sci_arttext>. Accessed: Ago. 16, 2014. doi: 10.1590/S0074-02762004000500004.
- BLANC, C.; ROBERT, A. Cinquième observation de kala-azar congénital. **Presse Médicale**, v.13, p.1751, 1984. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6235503>>. Accessed: Ago. 16, 2014.
- BLANC, G.; CAMINOPTEROS, J. La transmission du Kala-Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.191, p.1162-1164, 1930.
- BOGGIATTO, P.M. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, p.1019, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075227/>>. Accessed: Ago. 16, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0001019.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, v.10, n.61, p.04-05, 2003.

BRITO, F.L.C. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.768-775, 2006. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000500011>. Accessed: Ago. 16, 2014. doi: 10.1590/S0102-09352006000500011.

CARACAPPA, S. et al. Identificazione di *Leishmania* in cagne gravide e tessuti fetali mediante PCR e isolamento: nota preliminare. **Atti Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v.54, p.213-214, 2000.

CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumor parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, v.27, n.7, p.549-553, 2003. Available from: <<http://www.springerlink.com/content/v4n5pj0776073621/>>. Accessed: Ago. 16, 2014. doi: 10.1023/A:1026047725012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007. Available from: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11/full/nrmicro1748.html>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.1038/nrmicro1748.

COUTINHO, M.T. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.149-155, 2005. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401704005461>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: : 10.1016/j.vetpar.2004.11.011.

COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v.147, p.320–325, 2007. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521814>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: :10.1016/j.vetpar.2007.04.008.

DANTAS-TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v.106, p.857-60, 2010a. Available from: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-1722-4>>. Accessed: 13 Ago. 2014. doi: 10.1007/s00436-010-1722-4.

DANTAS-TORRES, F. et al. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental Parasitology**, v.125, p.184-185, 2010b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138871>>. Accessed: Ago. 31, 2014. doi: 10.1016/j.exppara.2010.02.003.

DE FREITAS, E. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.159-67, 2006. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705006035>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.011.

DIAZ, M.P. et al. Lesiones testiculares y epididimarias en La leishmaniasis visceral canina, de presentacion natural. **Higia Pecoris**, v.4, n.10, p.5-25, 1982.

DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.2, n.1, p.24-33, 2008. Available from: <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/viewFile/318/178>>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi:10.3855/jidc.318.

DINIZ, S.A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v.42, n.5, p.650-658, 2005. Available from: <<http://vet.sagepub.com/content/42/5/650.full.pdf>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.1354/vp.42-5-650.

DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, p.1266-1269, 2005. Available from: <http://www.researchgate.net/publication/7502033_Placentitis_associated_with_leishmaniasis_in_a_dog>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi: 10.2460/javma.2005.227.1266.

FERREIRA, M.G.P.A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.150-154, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595512>>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.026.

FREEMAN, K.S. et al. Leishmaniasis in a dog native to Colorado. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.237, p.1288-1291, 2010. Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118014>>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi: 2460/javma.237.11.1288.

GIBSON-CORLEY, K.N. et al. Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. **Canadian Veterinary Journal**, v.49, p.1005-1008, 2008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553493/#_ffn_sectitle>. Accessed: Ago. 14, 2014.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitology**, v.18, n.8, p.332-334, 2002. Available from: <[http://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(02\)02352-8?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492202023528%3Fshowall%3Dtrue?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492202023528%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(02)02352-8?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492202023528%3Fshowall%3Dtrue?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492202023528%3Fshowall%3Dtrue)>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02352-8.

HOSGOOD, G. Blood transfusion: a historical review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.197, p.998-1000, 1990.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v.22, n.9, p.439-445, 2006. Available from: <[http://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(06\)00173-5?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206001735%3Fshowall%3Dtrue?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206001735%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(06)00173-5?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206001735%3Fshowall%3Dtrue?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492206001735%3Fshowall%3Dtrue)>. Accessed: Ago. 11, 2014. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012.

LERNER, E.A. et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.11234-11236, 1991. Available from: <<http://www.jbc.org/content/266/17/11234.full.pdf+html>>. Accessed: Ago. 12, 2014.

LERNER, E.A.; SHOEMAKER, C.B. Maxadilan: cloning and functional expression of the gene encoding thipotent vasodilator peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v.26, p.1062-1066, 1992. Available from: <<http://www.jbc.org/content/267/2/1062.long>>. Accessed: Ago. 12, 2014.

LOW, G.C.; COOKE, W.E. A congenial infection of kala azar. **Lancetii**, p.1209-1211, 1926.

MANCIANTI, F.; SOZZI, S. Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p.402, 1995. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570879>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1016/0035-9203(95)90028-4.

MARINO, G. et al. Clinicopathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.323-327, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22489831>>. Accessed: Ago. 14, 2014. doi: 111/j.1748-5827.2012.01201.x.

MASUCCI, M. et al. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. **Veterinary Research Communications**, v.27, suppl.1, p.771-774, 2003. Available from: <<http://www.springerlink.com/content/j434w6w7r1k54q57/>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1023/B:VERC.0000014268.61966.69.

MCKENZIE, K.K. **A study of the transmission of canine leishmaniasis by the tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille), and an ultrastructural comparison of the promastigotas**. 1984. 232f. [PhD Dissertation] Oklahoma – Oklahoma State University.

MIR, F. et al. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p.419-422, 2012. Available from:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22690941>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01224.x.

MORAIS, R.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, v.59, p.473-48, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132326>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1007/s10493-012-9611-4.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p.1561-1577, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257344>>. Accessed: Ago. 12, 2014.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, p.67, 2012. Available from: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/67>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1186/1756-3305-5-67.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.

OLIVEIRA, V.V.G. **Avaliação das lesões inflamatórias e da carga parasitária em órgãos do sistema genital masculino e feminino de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)**. 2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Curso de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.

OWENS, S.D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, p.1076-1083, 2001. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>>. Accessed: Ago. 12, 2014. doi: 10.1016/S0887-7963(02)80076-1.

PANGRAZIO, K.K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.327-331, 2009. Available from:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19647368>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.013.

PETERSEN, C.A. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.24, p.182-188, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945086>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1053/j.tcam.2009.06.006.

PETERSEN, C.A.; BARR, S.C. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.39, p.1065-1074, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932363>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.008.

PIZARRO, M. et al. Lésions testiculaires et épидидymaires chez les chiens leishmaniens. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.165, p.441-447, 1989.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. **Parasitology Today**, v.12, p.412, 1996. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275299>>. Accessed: Ago. 09, 2014. doi: 10.1016/0169-4758(96)90062-9.

ROSYPAL, A.C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v.91, p.970-972, 2005. Available from: <<http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/GE-483R.1?journalCode=para>>. Accessed: Ago. 09, 2014. doi: 10.1645/GE-483R.1.

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. **Journal of Parasitology**, v.91, p.1113-1115, 2005. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419756>>. Accessed: Ago. 09, 2014. doi: 10.1645/GE-586R.1.

SHERLOCK, I.A. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.16, p.19-26, 1964.

SILVA, F.L. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.1, p.86-90, 2008. Available from:

<http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=03044017&issue=v151i0001&article=86_gladobniwlc&search_term=%28refkey%3D%28Silva%232008%2386%23*%29volkey%3D%2803044017%23151%2386%231%29%29>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.09.032.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.55-59, 2009a. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708006031>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

SILVA, S.M. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.159-162, 2009b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733439>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709003124>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SYMMERS, W.S.C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet**, v.16, p.127-132, 1960. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13836213>>. Accessed: Ago. 13, 2014.

TABAR, M.D. et al. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, p.325-328, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422503>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.1111/j.1748-5827.2008.00542.x.

TOMÁS, A.M.; ROMÃO, S.F. Biologia do parasita. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. (Eds.). **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. Cap.1, p.7-26.

TURCHETTI, A.P.et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, p.403-407, 2014. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727504>>. Accessed: Ago. 13, 2014. doi: 10.3855/jidc.4108.

CAPÍTULO II:

**MOLECULAR EVIDENCE OF EARLY VERTICAL TRANSMISSION OF
Leishmania (Leishmania) infantum IN A DOG**

**EVIDÊNCIA MOLECULAR DA TRANSMISSÃO VERTICAL PRECOCE DE
LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM EM UM CÃO**

Artigo publicado em:

Ciência Rural, Santa Maria, v.47: 01, e20160553, 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160553>

ISSNe 1678-4596

Molecular evidence of early vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a dog

Evidência molecular da transmissão vertical precoce de *Leishmania (Leishmania) infantum* em um cão

Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira^{I V*}; Rafael Antonio Nascimento Ramos^{II}; Carlos Alberto do Nascimento Ramos^{III}; Neurisvan Ramos Guerra^I; Frederico Celso Lyra Maia^{IV}; Leucio Câmara Alves^{IV}; Valdemiro Amaro da Silva Junior^{IV}

^IDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Avenida Bom Pastor s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE, 55292-270, Brasil.

^{III} Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária 549, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.

^{IV}Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

^VCentro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE 55608 - 680, Brasil.

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. A transmissão deste parasito para hospedeiros é principalmente vetorial. No entanto, rotas alternativas de infecção têm sido investigadas, especialmente em áreas onde o vetor biológico está ausente. O período exato de infecção e se a transmissão *in utero* ocorre ainda não está totalmente elucidada. Este estudo demonstra uma evidência molecular da transmissão vertical de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião. As amostras (vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, corno do útero e ovários) de uma fêmea naturalmente infectada por *L. infantum* e de seu embrião foram analisados molecularmente por meio de qPCR e cPCR, seguido de sequenciamento de DNA. A estimativa da idade gestacional foi de 23±1 dia. Na qPCR, a presença de DNA de *L. infantum* foi detectado em todas as amostras (n=7) analisadas, incluindo o embrião. No entanto, na PCR convencional, apenas quatro amostras

(vagina, cérvix, corpo do útero e embrião) foram positivas. Este estudo demonstrou que a transmissão de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião pode ocorrer nos primeiros dias de prenhez. Em conclusão, de acordo com o conhecimento dos autores, este é o primeiro relatório evidenciando infecção de embrião canino por *L. infantum*.

Palavras-chave: leishmaniose, cão, infecção vertical, embrião.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by the protozoon *Leishmania infantum*. Transmission of this parasite to hosts occurs mainly through the bite of infected sand flies. However, alternative infection routes have been hypothesized, especially in areas where the biological vector is absent. The exact time of infection and whether *in utero* transmission occurs have still *not been fully elucidated*. This report demonstrates molecular evidence of vertical transmission of *L. infantum* from a pregnant dog to the embryo. Samples (e.g. vulva, vagina, cervix, uterine body, uterine horn and ovaries) from a female naturally infected by *L. infantum* and from her embryo were molecularly analyzed by means of qPCR and cPCR followed by DNA sequencing. The gestational age was estimated to be 23±1 day. Through qPCR, the presence of *L. infantum* DNA was detected in all the samples analyzed (n=7), including the embryo, conversely through cPCR, only four samples (vagina, cervix, uterine body and embryo) were positive. This study demonstrated that transmission of *L. infantum* from a pregnant dog to the embryo might occur in the early days of pregnancy. In conclusion, this is the first report showing *L. infantum* infecting a canine embryo.

Key words: leishmaniasis; dog; vertical infection; embryo.

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante doença parasitária que afeta mamíferos e é transmitida principalmente por vetores pertencentes à sub-família Phlebotominae. No entanto, rotas alternativas de transmissão entre os cães têm sido propostas na LV (OLIVEIRA et al., 2015). Por exemplo, o envolvimento de carrapatos na transmissão da *Leishmania infantum*, especialmente *Rhipicephalus sanguineus*, foi demonstrado pela primeira vez na França em 1930, através da observação da capacidade desses carrapatos em transmitir mecanicamente o protozoário para roedores (BLANC & CAMINOPETROS, 1930). Da mesma forma, o papel potencial das pulgas têm sido avaliado (FERREIRA et al., 2009), mas o real papel desses ectoparasitos na epidemiologia da *L. infantum* continua a ser uma questão controversa.

Além disso, ao longo dos últimos anos, as transmissões venérea e vertical deste protozoário foram demonstradas como possíveis vias de infecção, especialmente em áreas onde os vetores biológicos estão ausentes (OLIVEIRA et al., 2015). Esta hipótese é suportada pela recuperação de formas viáveis de *Leishmania* spp. no sêmen de cães infectados (SILVA et al., 2009a). Reforçando esta tese, foi demonstrado que este tipo de infecção relatado acima pode ocorrer entre um macho infectado e uma fêmea não infectada (SILVA et al., 2009b).

Por outro lado, embora a transmissão vertical em humanos tenha sido demonstrada já muito tempo (LOW & COOKE, 1926), este evento ainda não foi completamente elucidado em cães. De fato, até agora, todos os casos de transmissão vertical relatados na literatura científica têm descrito a transmissão entre a fêmea e o feto ou filhotes recém-nascidos (NAUCKE & LORENTZ 2012). O tempo exato da infecção e se a transmissão ocorre *in utero* permanecem desconhecidos. Portanto, o objetivo deste relatório foi fornecer evidência molecular da transmissão vertical de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião nos estágios iniciais da prenhez.

Uma cadela de raça mestiça naturalmente infectada por *L. infantum* diagnosticada pelo teste de imunofluorescência (IFAT $\geq$ 40) e exame parasitológico da medula óssea (RAMOS et al., 2013) foi usado neste estudo. Este animal veio do Centro de Controle de Doenças Zoonóticas da cidade de Caruaru (8 ° 16'59 "S e 35 ° 58'33" W), no estado de Pernambuco, Brasil.

Durante a necropsia, foi possível observar que o animal estava em fase precoce de prenhez. Por conseguinte, todo o trato reprodutor foi cuidadosamente removido, colocado em um frasco de plástico estéril e enviados para o laboratório. Posteriormente, o útero foi aberto e cinco embriões foram encontrados. Fragmentos da vulva, vagina, colo do útero, corpo do útero, trompa uterina e ovários e de um embrião foram coletados e armazenados em tubos de plástico estéreis para processamento molecular.

O DNA genômico do material coletado foi extraído utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen® Hilden-Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os procedimentos foram realizados utilizando micropipeta com filtro para evitar a contaminação.

A reação para detecção de DNA de *L. infantum* foi realizada utilizando-se os primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e a sonda TaqMan-MGB probe (FAM- 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'- non-fluorescent quencher-MGB) descritos por Francino et al. (2006).

Cada reação (12,5 μ l) continha 6,25 μ l de Taqman® Universal PCR Master Mix, cada primer na concentração de 900nM, sonda na concentração de 200nM, e 50ng de DNA molde.

O protocolo de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguidas de 42 ciclos de desnaturação (95°C por 10 seg) e anelamento-extensão (60°C por 30 seg). Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata contendo em cada bateria de reação controle negativo (DNA de cão proveniente de área não endêmica) e positivo (DNA proveniente de cultura in vitro de *L. infantum*).

As amostras positivas em qPCR foram novamente testadas por meio de cPCR usando os primers MC1 (5'GTTAGCCGATGGTGGTCTTG3 ') e MC2 (5'CACCCATTTTCCGATTTTG3') (CORTES et al., 2004). Os amplicons (embrião e corpo uterino) foram, em seguida, purificados utilizando Qiaex II kit (Qiagen®, Hilden, Germany) e

sequeenciados em ambas as direcções por meio de método de Sanger (Sanger et al., 1977) em sequeenciador automático (ABI-3130; Applied Biosystems). Identificação da sequência de DNA foi determinada por comparações com sequências disponíveis no GenBank®, utilizando a ferramenta de busca de BLASTn (Altschul et al., 1990).

Com base nas características macroscópicas do sistema reprodutivo (edema uterino) e morfologia do embrião (embrião em forma de C), a idade gestacional foi estimada em 23 ± 1 dia. O embrião tinha 1 cm de comprimento e foi particularmente caracterizada pela presença de brotos de membros anteriores e posteriores.

Através qPCR, a presença de DNA de *L. infantum* foi detectado em todas as amostras analisadas ($n = 7$), incluindo o embrião. Por outro lado, através cPCR, apenas quatro amostras foram positivas (vagina, colo, corpo do útero e embrião). A busca por homologia na base de dados GenBank® mostraram similaridade de 98-99% (para ambas as sequências) com sequências de DNA de *L. infantum*. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas em GenBank® sob os números de adesão KT735370 e KT735371.

Este relatório fornece evidência molecular de transmissão vertical *in utero* de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião nos primeiros dias de gestação. Ao longo dos últimos anos, o papel vetorial de invertebrados na transmissão de *L. infantum* entre os mamíferos tem sido estudado; no entanto outras vias potenciais de infecção foram especuladas. Em cães, tem sido sugerido que esta transmissão pode ocorrer através da transfusão de sangue (OWENS et al., 2001), e através de vias venéreas e verticais (OLIVEIRA et al., 2015). Na verdade, a transmissão vertical nestes carnívoros domésticos foi demonstrada pela primeira vez na Itália, onde parasitos foram isolados a partir do fígado, baço e linfonodos de filhotes recém-nascidos (MANCIANTI & SOZZI, 1995). No entanto, esta via de infecção permaneceu controversa por um longo tempo e vários autores afirmaram que esta era uma via de transmissão incomum. Por exemplo, um estudo anterior conduzido em uma área endêmica brasileira, em que foram analisadas 63 filhotes de 18 cães naturalmente infectados, concluiu-se que *L. infantum* não foi transmitida verticalmente, uma vez que, no final do estudo, todos os cachorros foram negativos em exame molecular (ANDRADE et al., 2002). Por outro lado, mais recentemente, esta via de transmissão foi demonstrado no Brasil (SILVA et al., 2009a), nos EUA (BOGGIATTO et al., 2011) e na Alemanha (NAUCKE & LORENTZ, 2012). No entanto, todos os casos de transmissão vertical relatados na literatura científica até agora descrevem transmissão entre fêmeas e fetos ou filhotes recém-nascidos, mas nunca de um embrião.

Este é o primeiro relato de detecção de DNA *L. infantum* em um embrião com idade de 23 ± 1 dias. Neste estudo, a retirada do embrião diretamente do útero impediu o contato com o canal vaginal, reduzindo assim a possibilidade de contaminação. Com efeito, DNA *L. infantum* já foi detectado no útero de uma fêmea prenhe (ROSYPAL et al., 2005), e formas amastigotas foram observados no trofoblasto da placenta (DUBEY et al., 2005). Tem sido demonstrado que a circulação de parasitos no sangue da fêmea para a placenta e anexos permite a passagem de *L. infantum* para o feto (SILVA et al., 2009a).

O tempo exato da infecção da transmissão vertical ainda é desconhecida. Com base nas conclusões deste relatório, a passagem de *L. infantum* de uma fêmea para o embrião pode ocorrer nos primeiros dias de prenhez. Por conseguinte, esta via de transmissão necessita ser levada em consideração no que se diz respeito à propagação da infecção em cães. Finalmente, esta é a primeira detecção de *L. infantum* infectando um embrião canino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

COMITE DE ÉTICA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (protocolo: 23.082,015186 / 2012).

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.21, p.403-410, 1990. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602>>. Accessed: Jul. 13, 2016. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- ANDRADE, H.M. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.71-81, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701005520>>. Accessed: Ago. 16, 2016. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00552-0.
- BLANC, G.; CAMINOPTEROS, J. La transmission du Kala-Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v.191, p.1162-1164, 1930.
- BOGGIATTO, P.M. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, p.1019, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075227/>>. Accessed: Ago. 16, 2016. doi: 10.1371/journal.pntd.0001019.
- CORTES, S. et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.12-17, 2004. Available from: <<http://trstmh.oxfordjournals.org/content/98/1/12.long>>. Accessed: Ago. 16, 2016. doi: 10.1016/S0035-9203(03)00002-6.
- DUBEY, J.P. et al. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, p.1266-1269, 2005. Available from: <http://www.researchgate.net/publication/7502033_Placentitis_associated_with_leishmaniasis_in_a_dog>. Accessed: Ago. 11, 2016. doi: 10.2460/javma.2005.227.1266.

FERREIRA, M.G.P.A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.150-154, 2009. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19595512>>. Accessed: Ago. 11, 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.026.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.214-221, 2006. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473467>>. Accessed: Jul. 13, 2016. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011.

LOW, G.C.; COOKE, W.E. A congenital infection of kala azar. **Lancet**, v.2, p.1209-1211, 1926.

MANCIANTI, F.; SOZZI, S. Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.89, p.402, 1995. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7570879>>. Accessed: Ago. 12, 2016. doi: 10.1016/0035-9203(95)90028-4.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, p.67, 2012. Available from: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/67>>. Accessed: Ago. 12, 2016. doi: 10.1186/1756-3305-5-67.

OLIVEIRA, V.V.G. et al. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v.45, p.1622-1628, 2015. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000901622>. Accessed: Ago. 12, 2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20141368

OWENS, S.D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, p.1076-1083, 2001. Available from:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>>. Accessed: Ago. 12, 2016. doi: 10.1016/S0887-7963(02)80076-1.

RAMOS, R.A.N. et al. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.22, p.346-350, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142164>>. Accessed: Ago. 12, 2016. doi: 10.1590/S1984-29612013000300005.

ROSYPAL, A.C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v.91, p.970-972, 2005. Available from: <<http://www.journalofparasitology.org/doi/abs/10.1645/GE-483R.1?journalCode=para>>. Accessed: Ago. 09, 2016. doi: 10.1645/GE-483R.1.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.55-59, 2009a. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708006031>>. Accessed: Ago. 10, 2016. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

SILVA, S.M. et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.159-162, 2009b. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733439>>. Accessed: Ago. 10, 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

CAPÍTULO III:

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE TIAZÓIS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*

Estudo da atividade biológica *in vitro* de tiazóis sobre *Leishmania (Leishmania) infantum*

Vinícius V. G. Oliveira^{1,6*}, Mary A. A. Souza², Rafaela R. M. Cavalcanti², Marcos V. O. Cardoso³; Ana Cristina L. Leite⁴, Regina C. B. Q. Figueiredo², Valdemiro A. Silva Junior⁵

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Autor para correspondência.

² Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil.

³Colegiado de Nutrição, Universidade de Pernambuco, PE, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁵Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil.

⁶Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

RESUMO

Na prospecção de possíveis agentes contra doenças negligenciadas tais como as leishmanioses, diversos compostos tiazólicos apresentam-se como candidatos promissores, sendo conhecidos por apresentarem atividade contra parasitos tripanosomatídeos. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de compostos tiazólicos sobre *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral. Para tal, foram avaliados os efeitos de 10 compostos tiazólicos, sendo 5 tiazooacetilpiridinas (TAPs-01; 04; 05; 06; 09) e 5 tiazopiridinas (TPs-01; 04; 05; 06; 09) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* além da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Análises ultraestruturais foram realizadas para identificar possíveis alvos intracelulares do composto mais eficaz sobre formas promastigotas. Para buscar rotas que esclareçam o possível mecanismo de ação dos compostos sobre as formas amastigotas intracelulares, foi realizada a dosagem de Nitrito. Os dez compostos inibiram o crescimento de formas promastigotas e apresentaram baixa citotoxicidade, sendo mais seletivos para o parasito que para as células de mamífero. Todos os compostos testados foram capazes de diminuir a infecção dos macrófagos. Houve diminuição significativa do índice de sobrevivência das formas amastigotas quando comparados com as células não tratadas, sendo a TAP-04 a que apresentou o melhor índice. O composto TAP-04 induziu alterações ultraestruturais

indicativas de morte celular por apoptose. Nenhum dos grupos de macrófagos infectados com *L. infantum* e posteriormente tratados apresentaram aumento na liberação de nitrito. Por fim, a baixa toxicidade às células de mamíferos e a atividade leishmanicida apresentadas demonstram que o planejamento de drogas baseados nos núcleos tiossemicarbazona, tiazol e piridina são promissores para o tratamento da LV.

Palavras-chave: Quimioterapia; ultraestrutura; citotoxicidade; leishmaniose

ABSTRACT

In the prospection of possible agents against neglected diseases such as leishmaniasis, several thiazole compounds are presented as promising candidates and are known to have activity against trypanosomatid parasites. Thus, this work aimed to evaluate the effects of thiazole compounds on *Leishmania infantum*, etiological agent of visceral leishmaniasis. For this, the effects of 10 thiazole compounds, 5 thiazoacetylpyridines (TAPs-01; 04; 05; 06; 09) and 5 thiazopyridines (TPs-01; 04; 05; 06; 09) on promastigote and amastigote forms of *L. infantum* and the cytotoxicity in peritoneal macrophages of BALB/c mice were evaluated. Ultrastructural analyzes were performed to identify possible intracellular targets of the most effective compound on promastigote forms. In order to observe routes that can clarify the possible mechanism of action of the compounds on the intracellular amastigote forms, the Nitrite dosage was performed. All compounds inhibited the growth of promastigote forms and presented low cytotoxicity, being more selective to the parasite than to mammalian cells. All compounds tested were able to decrease macrophage infection. There was a significant decrease in the survival rate of the amastigote forms when compared to the untreated cells, with TAP-04 presenting the best index. TAP-04 compound induced ultrastructural changes that are related to cell death by apoptosis. None of the macrophage groups infected with *L. infantum* and subsequently treated showed increased nitrite release. Finally, the low toxicity to mammalian cells and the leishmanicidal activity observed demonstrate that the synthesis of drugs based in thiosemicarbazone nucleus, thiazole and pyridine derivatives are promising to the treatment of VL.

Key words: Chemotherapy; ultrastructure; cytotoxicity; leishmaniasis

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma importante zoonose parasitária (COSTA, 2008) causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (SHAW, 1994) e tem os cães como os principais reservatórios do parasito no ambiente urbano no Brasil (DINIZ et al., 2008). A transmissão da LV entre mamíferos é essencialmente vetorial (OLIVEIRA et al., 2015), embora existam hipóteses de transmissão direta de cão a cão, como a transmissão vertical transplacentária em cadelas (NAUCKE & LORENTZ, 2012), bem como a transmissão venérea (SILVA et al., 2009).

Apesar da existência de diversos protocolos de tratamento da LV em cães (REGUERA et al., 2016), a administração dos antimoniais pentavalentes, miltefosina e alopurinol são os medicamentos de primeira linha no combate ao parasito. Estes fármacos desencadeiam diversos efeitos colaterais, são de difícil administração e podem levar à resistência do parasito ao tratamento (YASUR-LANDAU et al., 2016) fazendo com que o tratamento seja longo, tedioso e desagradável para cães e tutores. Estas drogas podem potencializar ainda mais os danos renais associados à doença (REGUERA et al., 2016). Desta forma, alternativas foram introduzidas no tratamento de casos resistentes ao antimoniais como a pentamidina ou a anfotericina B em formulação liposomal. No entanto, estas drogas possuem alto custo e também apresentam toxicidade ao hospedeiro (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010). Diante deste panorama é evidente a necessidade de novas alternativas para o tratamento contra a LV em cães, através da utilização de drogas mais seguras e eficazes.

Entre outros grupos químicos explorados para atividades anti-protozoária, destacam-se as tiossemicarbazonas (BHARTI et al., 2004). Em acréscimo, a ciclização da tiossemicarbazona em tiazol e a condensação do anel piridínico com esta molécula gerada têm sido demonstradas desempenhando atividade tripanocida (CARDOSO et al., 2014). Os tiazóis são uma importante classe de compostos heterocíclicos que apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como atividades antitumoral (POPSAVIN et al., 2012), antibacteriana (LU et al., 2012), anti-inflamatória (SHAFI et al., 2012), antichagásico (NAVARRETE-VAZQUEZ et al., 2011) e leishmanicida (NAVA-ZUAZO et al., 2014). Tem sido demonstrado, que enzimas cisteíno-proteases de *L. infantum* são identificadas como alvos de compostos tiazólicos (UEDA-NAKAMURA et al., 2001; CARDOSO et al., 2014). Estas enzimas desempenham importantes funções em *Leishmania* como na virulência, manutenção

da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro e a modulação de sua resposta imunológica (MOTTRAM et al., 2004).

Desta forma, observando o potencial leishmanicida de novos derivados tiazólicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica *in vitro* de uma série de tiazóis sobre *L. infantum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DERIVADOS TIAZÓLICOS - Foram utilizados cinco derivados tiazólicos da série de tiazopiridinas (TP) e cinco da série de tiazaoacetilpiridinas (TAP). São eles, N-(2-metil-piridina)-N'-(feniltiazol-2-il)-hidrazina (TP-01); N-(2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TP-04); N-(2-metil-piridina)-N'-(P-fluorofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TP-05); N-(2-metil-piridina)-N'-(p-anisaltiazol-2-il)-hidrazina (TP-06); N-(2-metil-piridina)-N'-(3,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TP-09); N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(feniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-01); N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-04); N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(P-fluorofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-05); N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-anisaltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-06) e N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(3,4-diclorofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-09)]. A metodologia de síntese destes compostos foi realizada a partir de reagentes químicos de alto grau de pureza descrita por CARDOSO et al. (2014) (Figura 1).

2.2 PARASITOS- Formas promastigotas de *L. infantum* (Cepa BH 46) foram mantidas a 26° C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e utilizadas na fase exponencial de crescimento. As formas amastigotas foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas infectivas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

2.3 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULA DE MAMÍFERO- Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c tratados ou não com diferentes concentrações (2,78; 5,56; 11,12; 22,25; 44,5 µM) dos compostos foram avaliados quanto a sua viabilidade pelo método de Ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo®. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (10⁶ células/mL). Após 48h de tratamento ou não com os compostos foi possível determinar a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos peritoneais (CC₅₀). A citotoxicidade dos compostos para macrófagos peritoneais e sua atividade contra formas promastigotas foram comparadas para determinar o índice de

seletividade ($ISe/pro = CC_{50}$ de macrófagos / IC_{50} de formas promastigotas). Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA- FIOCRUZ L-039/12).

2.4 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE O CRESCIMENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS - Formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10% de SFB a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Após a diluição, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações (2,78-44,5 μM) dos compostos por 48 horas para determinar a concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}/pro). O crescimento da cultura foi acompanhado através de Ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo®. Células incubadas apenas com o meio Schneider's foram utilizadas como controle. Cada teste foi feito em 3 experimentos independentes em triplicata.

2.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS - Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, mantidos em meio RPMI -1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB, foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínula (10^6 cel/mL). Os macrófagos foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas para adesão e depois infectados com formas promastigotas utilizando uma razão 1:15 parasito/célula a 37 °C durante 14 h. Os parasitos não interiorizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada na presença ou ausência dos compostos selecionados pelos testes anteriores (TAP-01, TAP-04, TAP-06), nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 $\mu g/mL$, por 24 horas. As lamínulas foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). A concentração capaz de inibir em 50% a infecção dos macrófagos por formas amastigotas (IC_{50}/ama) foi estimada a partir da contagem direta das formas amastigotas intracelulares/100 células infectadas, através de microscopia de luz convencional. O índice de sobrevivência (ISO) foi determinado multiplicando-se o número de formas amastigotas pelo número de macrófagos infectados.

2.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL - Para a identificação de possíveis alvos intracelulares da ação da droga e prováveis efeitos deletérios dos compostos sobre a membrana do parasito, análises ultraestruturais através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV), respectivamente, foram realizadas. Para MET, formas promastigotas *L. infantum* controles e tratadas com TAP-04 ($1/2 IC_{50}$ e IC_{50}) por 48h, foram lavadas e fixadas

por 60 min em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) e pós-fixada por uma hora em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4), ferricianeto de potássio 0,8%, CaCl_2 5 mM em tampão cacodilato 0,1M. Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e incluídas em resina epoxy (Fluka Analytical). Cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo (Leica EMUC6). Em seguida, foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo para análise no microscópio de transmissão Zeiss EM109B. Para a MEV, formas promastigotas tratadas e controles foram fixadas como descrito acima e colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-lysina. Após 20 minutos, as lamínulas foram lavadas com PBS para retirada das células não aderidas e pós-fixadas como descrito para MET. Em seguida as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

2.7 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO - Para analisar o efeito dos compostos sobre a concentração de nitrito, 100 μL do sobrenadante da cultura de macrófagos infectados tratados ou não com os compostos por 24 horas foram incubados com 100 μL do reagente Griess (1% sulfanilamida e 0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto/2.5% H_3PO_4) à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida com um filtro de 540 nm no leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio.

2.8 ANÁLISE DOS DADOS- As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.(IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows e as análises de significância, considerando significativo valores $p < 0.05$, foram realizadas através do teste ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism 5.(GraphPad, Califórnia, EUA) para Windows.

3 RESULTADOS

3.1 CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C

Quando testados contra macrófagos peritoneais, alguns compostos apresentaram efeito citotóxico em concentrações de CC_{50} próximos aos valores de IC_{50}/pro determinados para *L. infantum*. No entanto, o cálculo do ISe/pro demonstrou que todos os compostos foram mais seletivos para o parasito na forma promastigota que para as células de mamífero. Dentre os compostos que apresentaram melhores índices de seletividade, se destacam TAP-01 ($ISe=12,73$), TAP-04 ($ISe=18,94$) e TAP-06 ($ISe=7,79$) (Tabela 1).

3.2 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. infantum*

A análise inicial do efeito dos compostos revelou que todos eles foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum*. Os valores de IC_{50} estimados variaram entre 0,42 e 22,55 μM (Tabela 1). Os compostos que foram mais efetivos, i.e. que apresentaram menores concentrações de IC_{50} foram TAP-05 ($0,42 \pm 0,03 \mu M$), TAP-09 ($2,73 \pm 0,61 \mu M$) e TAP-01 ($3,57 \pm 0,95 \mu M$).

3.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. infantum*

Como as formas amastigotas são as responsáveis pela manifestação clínica da doença, os compostos TAP-01, TAP-04 e TAP-06, os quais apresentaram maiores valores de ISe para promastigotas, foram escolhidos para os testes contra essa forma do parasito. Todos os compostos foram mais efetivos contra formas amastigotas do que para formas promastigotas. TAP-06 e TAP-04 foram cerca de sete vezes mais efetivos para formas intracelulares do parasito do que para formas promastigotas, enquanto que para TAP-01 esta diferença na atividade do composto foi de aproximadamente três vezes. Os valores de IC_{50}/ama foram de 0,99, 0,43 e 0,59 μM , respectivamente. As diferenças na atividade dos compostos sobre as formas amastigotas tiveram reflexo direto sobre os índices de seletividades destes para essas formas correspondendo aos valores de 46,10, 137,37 e 59,05 para TAP-01, TAP-04 e TAP-06, respectivamente. Desta forma, a TAP-04 se destaca por apresentar o melhor índice de seletividade para formas amastigotas (Tabela 1). Para as três concentrações dos compostos testadas (0,25, 0,5 e 1 $\mu g/mL$) houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) do ISO dos parasitos no interior do macrófago quando comparados com as células não tratadas. TAP-04

foi o composto que apresentou as maiores taxas de inibição da viabilidade das formas amastigotas no interior do macrófago. Na concentração de 1µg/mL a infecção dos macrófagos foi praticamente abolida (Figura 2).

3.4 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Tendo em vista que o composto TAP-04 foi o que apresentou melhor atividade contra as duas formas do parasito e também foi o menos tóxico, partiu-se para investigar possíveis alvos intracelulares de ação da droga bem como seus efeitos sobre a membrana celular do parasito através da MET e MEV. Conforme observado por MET, as formas promastigotas controle apresentaram morfologia característica, com o núcleo bem preservado, ocupando a parte mais central do citoplasma e cromatina associada com a membrana nuclear interna. Uma única mitocôndria contendo cinetoplasto, região onde se concentra o DNA mitocondrial (k-DNA) é encontrada próximo à bolsa flagelar onde o flagelo emerge (Figura 3a).

As células tratadas com 1/2 IC₅₀ apresentaram como principais características um inchaço na mitocôndria, além de intensa desorganização das cristas mitocondriais e na região do cinetoplasto, desorganização celular com deslocamento do núcleo para a periferia da célula e aumento dos perfis do retículo endoplasmático. Além destas alterações, observa-se desorganização das cisternas do complexo de Golgi (Figuras 3b, c, d), com intensa vesiculação desta organela. Estas alterações foram mais drásticas em células tratadas com IC₅₀/pro. Nestas células pode-se também observar alteração no volume dos acidocalcisomas e dos depósitos eletrondensos presentes nesta organela, perda do material da matriz mitocondrial e do citoplasma compatível com possíveis danos na membrana plasmática. (Figura 3e, f).

A MEV mostrou uma forma promastigota controle característica, apresentando um corpo celular alongado e uma membrana íntegra (Figura 4a, b). As células tratadas com 1/2 IC₅₀/pro (Figura 4 c, d) apresentaram alterações na forma do corpo celular que assume uma morfologia arredondada e perda do flagelo. Nas células mais drasticamente afetadas foi possível observar perda de volume celular com intenso enrugamento da membrana celular. No entanto, não foi possível observar a presença de debris celulares nem de danos aparentes na membrana das células, sugerindo uma morte celular por apoptose.

3.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A PRODUÇÃO DE NO

Tendo em vista o efeito dos compostos selecionados (TAP-01, TAP-04 e TAP-06) sobre as formas amastigotas, foram feitas análises para saber se estes efeitos poderiam estar relacionados a uma ativação da capacidade microbicida dos macrófagos, através da produção de NO. Desta forma foi realizada a dosagem de nitrito no sobrenadante de culturas infectadas tratadas ou não com estas drogas. Os dados indicam que nenhum dos grupos de macrófagos infectados com *L. infantum* e posteriormente tratados com as três drogas apresentaram aumento na produção de NO quando comparados com o controle infectado não tratado. Nas células tratadas com TAP-04 houve decréscimo significativo nas maiores concentrações testadas (Figura 5).

4 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm demonstrado que os compostos derivados de tiazóis podem apresentar uma importante atividade contra parasitos tripanossomatídeos (PATRICK et al., 2016; MOREIRA et al., 2013; ZELISKO et al., 2012; CHAN-BACAB et al., 2009). Para avaliação do potencial leishmanicida de derivados tiazólicos, foi realizado um *screening* da atividade biológica de dez compostos sobre formas promastigotas de *L. infantum*. Todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas. Porém, o tratamento com TAP-01, TAP-04 e TAP-06 foram considerados mais eficazes por apresentarem menores valores de IC₅₀/pro e maiores índices de seletividade quando comparados aos demais compostos sendo a TAP-04 o composto que apresentou maior ISe/ama.

Para a série TP, comparando-se o composto-base sem substituinte (TP-01, <2,78 µM), com os compostos substituídos, observa-se que dos compostos substituídos, apenas o TP-06 (OMe) apresentou atividade leishmanicida equivalente. Os compostos TP-04 (Br), TP-05 (F) e TP-09 (Cl) foram menos potentes que o TP-01. Para a série TAP, todos os compostos se destacam pela sua alta atividade leishmanicida, obtendo-se melhores resultados com os compostos TAP-05 (F, 0,42 µM) e TAP-09 (Cl, 0,99 µM), sendo o TAP-05 até 8 vezes mais potente que o composto-base, sem substituinte (TAP-01, 2,73 µM). Para a série TAP, todos os compostos se destacam pela sua alta atividade leishmanicida, sendo melhor que os compostos da série TP. Tais resultados são muito semelhantes aos encontrados nas formas tripomastigotas e epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (CARDOSO et al., 2014). Estes autores identificaram que a série TAP apresentou excelente atividade inibitória na cruzaina, sendo maior que os compostos da série TP. Ambos os resultados demonstram a importância da metila para a atividade antichagásica e leishmanicida. De fato, a presença de metilas na estrutura química tende a melhorar a lipossolubilidade, melhorando desta forma a biodisponibilidade com consequente aumento na atividade biológica dos compostos (CARDOSO et al., 2014; ZELISKO et al., 2012).

De forma semelhante aos resultados aqui apresentados com compostos tiazólicos, foi demonstrada uma potente atividade contra promastigotas de *L. braziliensis* de naftotiazóis, além de que, os compostos por eles testados reduziram o índice de sobrevivência de formas amastigotas do parasito em macrófagos de mamíferos (TOLEDO et al., 2013). Adicionalmente, estudos realizados por Nava-Zuazo et al. (2014) também demonstraram que compostos contendo o anel tiazólico em sua estrutura foram capazes de inibir formas

promastigotas de *L. amazonensis*. Tais resultados demonstraram que os compostos tiazólicos possuem promissora atividade leishmanicida. Vale ressaltar que os compostos aqui estudados são inéditos no estudo da atividade biológica *in vitro* sobre *L. infantum*.

Um importante critério na prospecção de novos compostos com ação leishmanicida é que eles não sejam tóxicos às células de mamíferos (BHARGAVA e SINGH, 2012). Portanto, não somente o efeito dos compostos sobre o crescimento foi considerado como também foi avaliado o potencial citotóxico destes sobre células de mamífero. A baixa toxicidade de alguns compostos em relação às células de mamífero quando comparado com drogas de referência como o Glucantime (727,63 μM) (PALADI et al., 2012) teve um reflexo direto nos valores de ISe/pro, os quais foram sempre mais seletivos para os parasitos do que para as células de mamífero. Mesmo o composto com maior valor de CC_{50} entre os 10 aqui testados, TP-05 (109,67 μM), apresentou-se quase 7 vezes menos citotóxico em relação ao Glucantime. A citotoxicidade em macrófagos peritoneais tratados com derivados tiazopiridínicos pode ser atribuída à presença do anel piridínico, uma vez que já foi demonstrado que o grupamento tiazol não é tóxico e que o mesmo melhora a viabilidade celular das tiosemicarbazonas através da funcionalização da tiocarbonila a tiazol (CARDOSO et al., 2014).

O composto TAP-04 foi selecionado para análise da ultraestrutural por MET por demonstrar maior seletividade ao parasito em detrimento da célula do hospedeiro. Após 48h de tratamento, foi possível observar diversas alterações morfológicas nos parasitos de maneira dose-dependente como completa desorganização das cristas mitocondriais. Diversas drogas têm como principal alvo de ação a mitocôndria (RODRIGUES E SOUZA, 2008; AFFRANCHINO et al., 1989), sendo esta uma organela crucial para a sobrevivência de diversos tipos celulares, em especial para os tripanossomatídeos que possuem apenas uma única mitocôndria. Alterações na mitocôndria de tripanossomatídeos causadas por drogas são comumente relatadas na literatura, mostrando que esta organela é particularmente sensível a ação de quimioterápicos (SANTA-RITA et al., 2004). Além disso, há o aparecimento de alterações no perfil de retículo endoplasmático, vesiculação e fragmentação do complexo de Golgi e aparecimento de estruturas típicas do processo autofágico. Resultados semelhantes em relação ao efeito leishmanicida foram demonstrados utilizando-se outra classe de derivados tiazólicos, onde a análise ultraestrutural evidenciou danos no núcleo, mitocôndria e cinetoplasto de formas promastigotas de *L. infantum* (BILBAO-RAMOS et al., 2012). Finalmente, os estudos de microscopia eletrônica demonstram que os parasitos tratados com TAP-04 revelaram claramente alterações ultraestruturais compatíveis com morte celular

programada (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010): arredondamento da célula, condensação da cromatina e inchaço mitocondrial.

Levando em consideração que os compostos apresentaram considerável atividade leishmanicida para formas promastigotas e baixa toxicidade em células do hospedeiro, não se pode descartar a possibilidade que a forma amastigota intracelular também fosse sensível ao tratamento com os compostos escolhidos. Neste caso, os compostos podem exercer efeito direto sobre as células hospedeiras tornando-as mais competentes no combate a infecção (MacMICKING et al., 1997) ou sobre alvos terapêuticos importantes para a sobrevivência das formas amastigotas no macrófago. Além disso, os compostos selecionados para avaliação em formas amastigotas do parasito apresentam atividade de inibição das cisteíno-proteases (CARDOSO et al., 2014). Esta enzima desempenha importantes funções no parasito como manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito (SELZER et al., 1999; MOTTRAM et al., 2004) e ocorre em grandes quantidades em lisossomas, que são particularmente abundantes em formas amastigotas de *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA et al., 2001).

A descoberta de novos fármacos com potencial para se tornar medicamentos utilizáveis é um componente importante do ciclo de inovação de drogas, mas continua a ser um grande obstáculo no desenvolvimento de novos medicamentos para doenças tropicais infecciosas (NWAKA e HUDSON, 2006). O progresso atual dentro da rede de descoberta de fármacos foi, em parte, possível através do estabelecimento de critérios que selecionam o quanto bom um novo composto é (NWAKA et al., 2009). Esses critérios abrangem aspectos biológicos, físico-químicos e farmacocinéticos, bem como de segurança e toxicológicos da descoberta de drogas para várias doenças negligenciadas, incluindo leishmaniose (NWAKA et al., 2009; PINK et al., 2005). Entre estes critérios, podem ser citadas a estrutura química definida, rota sintética estabelecida e o composto deve apresentar índice de seletividade para amastigotas >20 (NWAKA et al., 2009). Dentro desta perspectiva, não só TAP-04, composto que demonstrou maior seletividade ao parasito em detrimento da célula do hospedeiro, como também TAP-01 e TAP-06 satisfazem estes critérios, pois possuem rota sintética estabelecida (CARDOSO et al., 2014). Digno de nota é o ISe/ama do TAP-04 (137,37), sendo aproximadamente 7 vezes superior ao mínimo estabelecido para uma droga ser considerada promissora (NWAKA et al., 2009).

Nos estágios iniciais da infecção no hospedeiro vertebrado, parasitos tripanossomatídeos são capazes de levar a célula infectada a disparar mediadores da inflamação como citocinas de perfil Th1 ou Th2, além de espécie reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (eg. NO) (IBRAHIM et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Os dados do presente

estudo demonstraram que o tratamento com os compostos tiazólicos foi capaz de induzir a redução significativa na infecção de células do exsudato peritoneal (PEC) por *L. infantum*. No entanto, a análise da produção de óxido nítrico por estas células demonstrou que não houve aumento significativo deste mediador da infecção em macrófagos infectados e tratados com os compostos. Diversos autores descrevem como mecanismo de defesa contra infecção por *Leishmania* sp., a liberação de citocinas do perfil Th2, anti-inflamatórias, a partir da ativação de fatores de regulação da resposta inflamatória (RODRIGUES et al., 2016; VOULDOUKIS et al., 1997). Os membros da família Bcl-2 são conhecidos como reguladores da apoptose em células de mamíferos e, conseqüentemente, mediadores da resposta a infecção parasitária, podem estar relacionados com a eliminação dos parasitos pela via de ativação de citocinas reguladoras da inflamação (PANDEY et al., 2016). Desta forma, a ativação de tais mediadores reguladores poderia modular o processo inflamatório que ocorre normalmente durante a infecção por *Leishmania* e, assim, inibir a produção exacerbada de óxido nítrico nestes macrófagos infectados (GEIGER et al., 2016; FORGET et al., 2006). No entanto, mais estudos ainda são necessários para seja possível compreender o mecanismo de atuação destes compostos sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*.

5 CONCLUSÃO

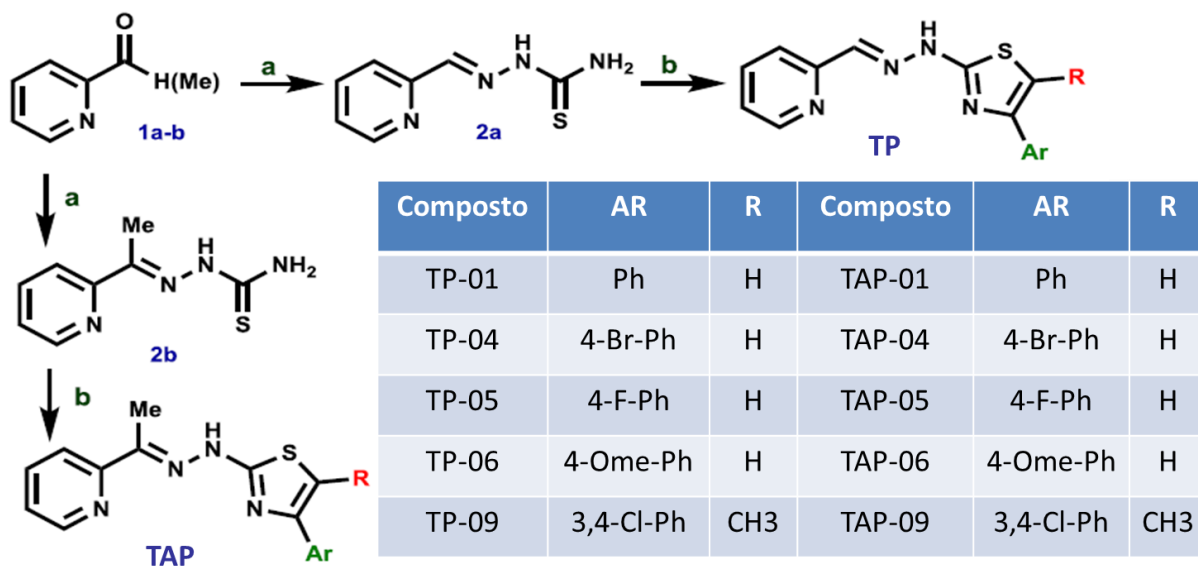
Estes resultados demonstraram que os compostos tiazólicos da série de tiazopiridinas (TP) e tiazacetilpiridinas (TAP) possuem promissora atividade leishmanicida. Além disso, vale ressaltar que trata-se de uma atividade seletiva para *L. infantum* com baixa toxicidade contra as células do hospedeiro.

Tabela 1. Efeito dos compostos sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

	Promastigota	Macrófago	Promastigota	Amastigota	Amastigota
	IC ₅₀	CC ₅₀	Índice de	IC ₅₀	Índice de
	μM		Seletividade (ISe)	μM	Seletividade (ISe)
TAP-01	3,57 $\pm$ 0,95	45,46 $\pm$ 11,66	12,73	0,99 $\pm$ 0,03	46,10
TAP-04	3,12 $\pm$ 0,86	59,09 $\pm$ 15,19	18,94	0,43 $\pm$ 0,11	137,37
TAP-05	0,42 $\pm$ 0,03	2,95 $\pm$ 0,29	7,07	-	-
TAP-06	4,44 $\pm$ 1,27	34,62 $\pm$ 13,21	7,79	0,59 $\pm$ 0,09	59,05
TAP-09	2,73 $\pm$ 0,61	4,31 $\pm$ 0,86	1,57	-	-
TP-01	<2,78	11,71 $\pm$ 1,21	N.D.	-	-
TP-04	7,01 $\pm$ 3,72	41,51 $\pm$ 1,70	5,92	-	-
TP-05	22,55 $\pm$ 0,97	109,67 $\pm$ 39,15	4,86	-	-
TP-06	<2,78	1,35 $\pm$ 0,19	N.D.	-	-
TP-09	5,52 $\pm$ 0,29	4,68 $\pm$ 1,87	0,84	-	-

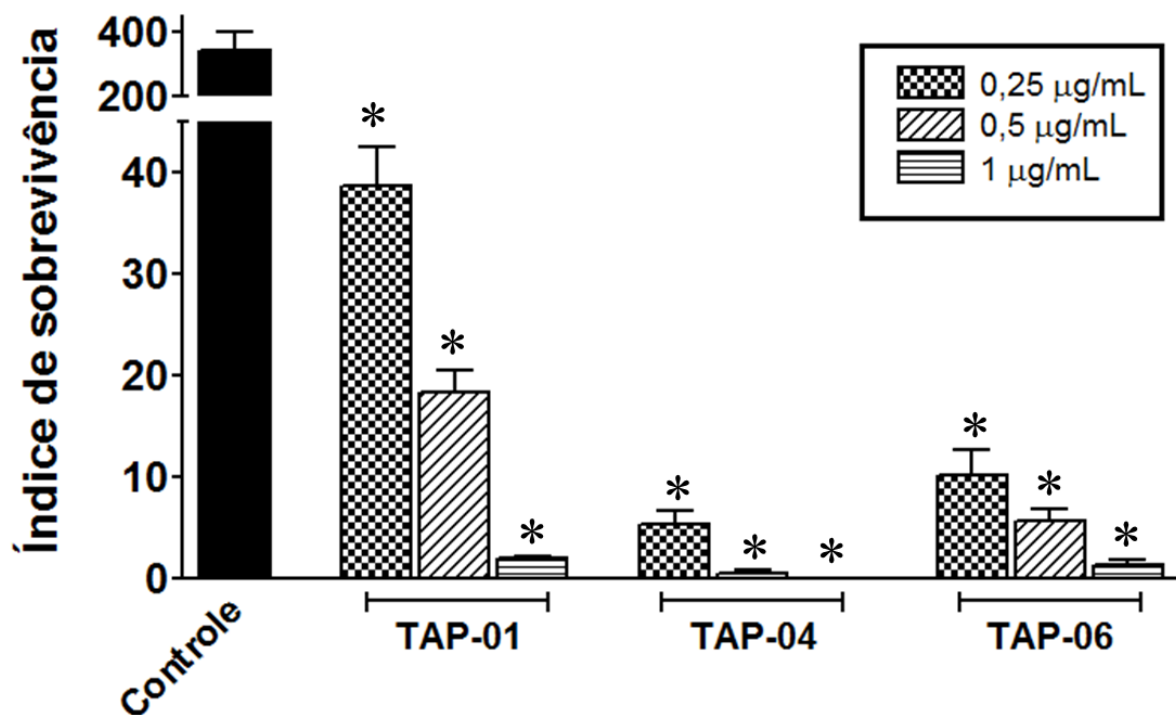
N.D. – não foi possível determinar.

Figura 1. Procedimentos sintéticos para tiossemicarbazonas (2a-b) e 2-(piridin-2-il)1,3-tiazol (TPs e TAPs). Reagentes e condições: (a) tiossemicarbazida, 2-propanol, ácido acético (3 gotas), irradiação ultrassônica, r.t., 120 min; (B) 2-bromoacetofenonas substituídas, 2-propanol, CaCO₃, irradiação ultrassônica, r.t., 60 min.



Adaptado de Cardoso et al., 2014.

Figura 2. Índice de sobrevivência (ISo) de *L. infantum* dentro de macrófagos após 24 horas de tratamento com os compostos TAP-01, TAP-04 e TAP-06.



Nota: Os asteriscos correspondem a valores significativos ($p < 0,05$)

Figura 3. Efeitos do composto TAP-04 sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *L. infantum*. **A:** Forma promastigota controle demonstrando morfologia preservada de mitocôndria (M), núcleo (N), cinetoplasto (C), bolsa flagelar (BF), flagelo (F) e glicossomo (*). **B, C, D:** Formas promastigotas tratadas com 0,5x a IC_{50} . Note desorganização das cristas mitocondriais e do cinetoplasto, desorganização celular com deslocamento do núcleo para a periferia da célula e aumento dos perfis do retículo endoplasmático (RE) e formação de vesículas atípicas nas cisternas do complexo de Golgi (CG). **E, F:** Formas promastigotas tratadas com a IC_{50} apresentando condensação da cromatina e maior desorganização das cristas mitocondriais.

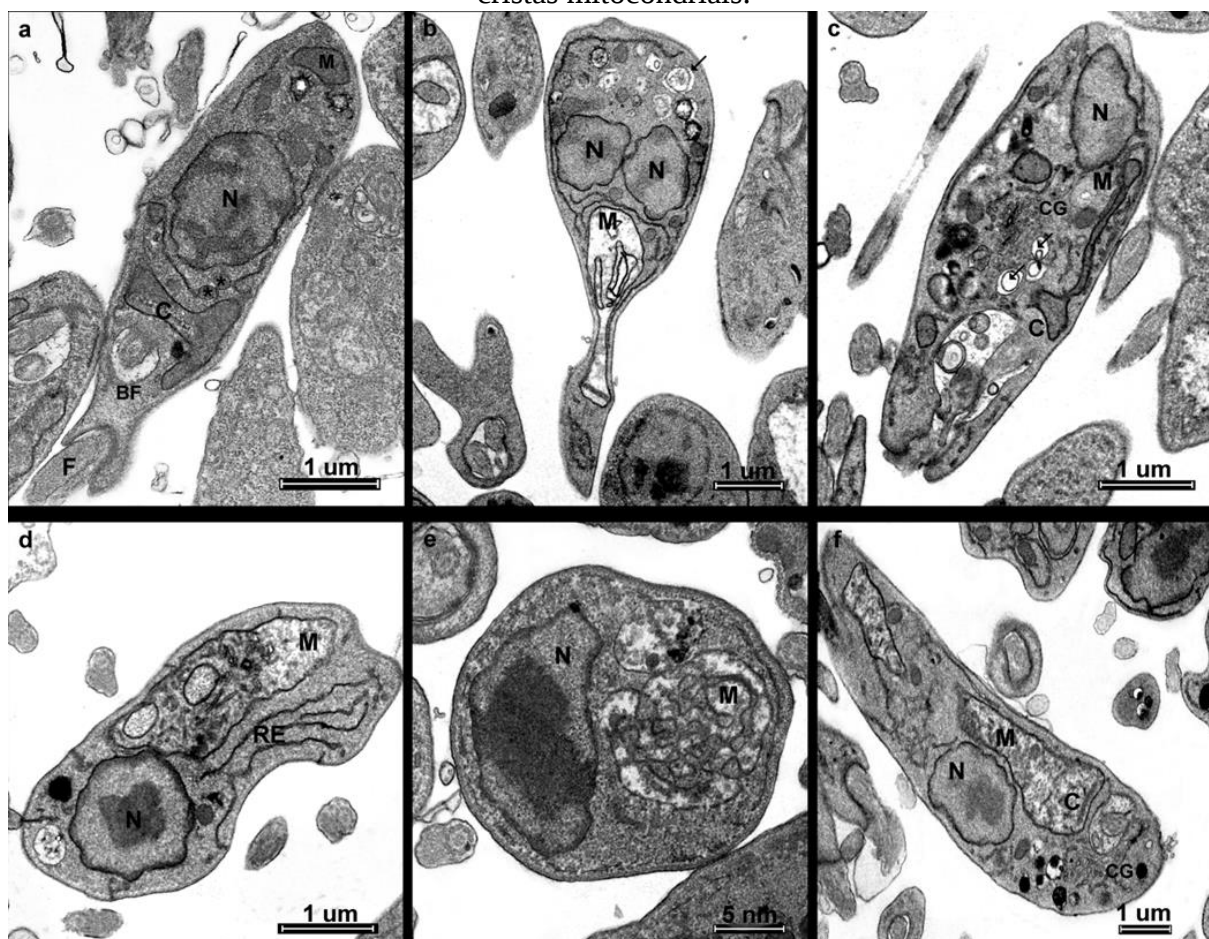


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura de formas promastigotas de *L. infantum*. **A,** **B:** Forma promastigota controle apresentando um corpo celular alongado e uma membrana íntegra. **C, D:** Formas promastigotas tratadas com 0,5x a IC_{50} demonstrando alterações na morfologia, formas arredondadas e perda do flagelo. **E, F:** Formas promastigotas tratadas com a IC_{50} apresentando perda da integridade da membrana com exposição do material citoplasmático demonstrados com o aparecimento de regiões eletrônicas na região do citoplasma.

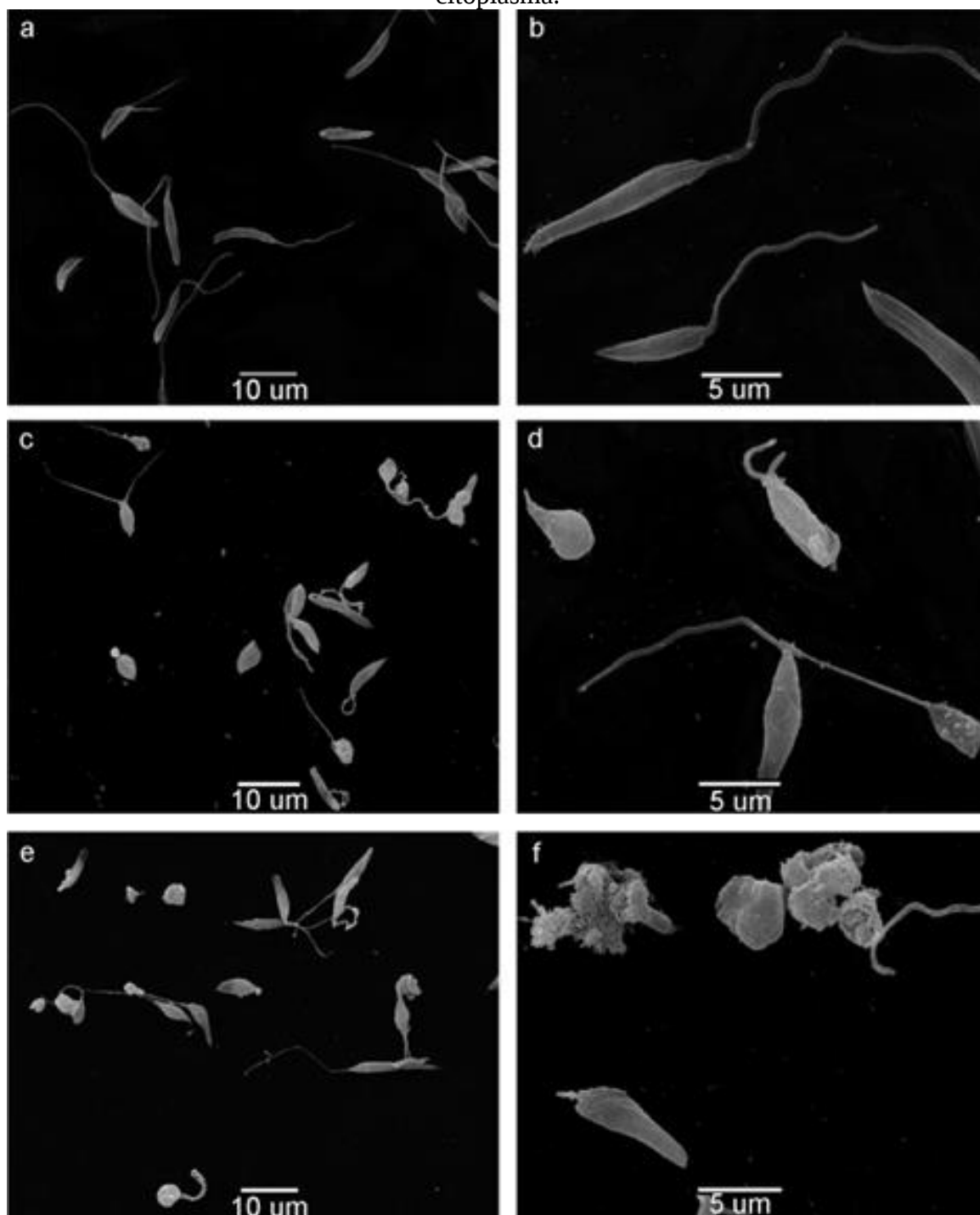
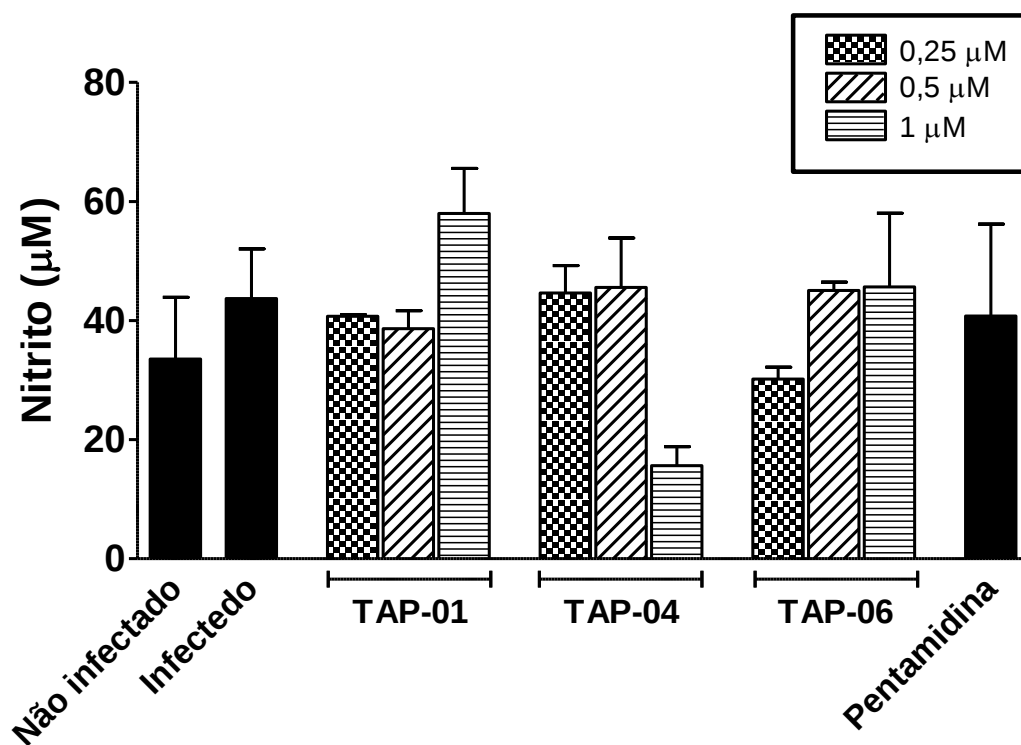


Figura 5. Dosagem de Nitrito presente no sobrenadante das culturas infectadas tratadas ou não com os compostos TAP-01, TAP-04 e TAP-06.



REFERÊNCIAS

- AFFRANCHINO, J. et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 34, n. 3, p.221-228, maio 1989.
- BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p.1-13, 2012.
- BHARTI, N. et al. Synthesis, characterization and in vitro anti-amoebic activity of new palladium(II) complexes with 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p.4679-4684, set. 2004.
- BILBAO-RAMOS, P. et al. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. **Parasitology international**, v. 61, n. 4, p. 604-613, dez, 2012.
- CARDOSO, M. V. de O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p.48-59, out. 2014.
- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p.167-176, 2010.
- CHAN-BACAB, M. J.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1292-1293, jun, 2009.
- COSTA, C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral Leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p.2959- 2963, 2008.
- DINIZ, S.A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, fev. 2008.
- FORGET, G. et al. Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*- Induced Inhibition of Nitric Oxide Production. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p.6272-6279, 20 out. 2006.

GEIGER, A. et al. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p.327-345, maio 2016.

LU, X. et al. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.164-171, mar. 2012.

IBRAHIM, M. K. et al. The Malnutrition-Related Increase in Early Visceralization of *Leishmania donovani* is Associated with a Reduced Number of Lymph Node Phagocytes and Altered Conduit System Flow. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, e.2329, 15 ago. 2013.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p.104, 2010.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323-350, abr. 1997.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p.375-381, ago. 2004.

MOREIRA, D. R. M. et al. Structural Design, Synthesis and Structure-Activity Relationships of Thiazolidinones with Enhanced Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. **Chemmedchem**, v. 9, n. 1, p.177-188, nov. 2013.

NAUCKE, T.J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p.67, abr. 2012.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G. et al. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p.3168-3171, maio 2011.

NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p.1626-1633, mar. 2014.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p.941-955, nov. 2006.

NWAKA, S. et al. Advancing Drug Innovation for Neglected Diseases—Criteria for Lead Progression. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, e.440, ago. 2009.

OLIVEIRA, V. V. G. et al. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p.1622-1628, set. 2015.

PALADI, C. S. et al. In Vitro and In Vivo Activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1626, mai. 2012.

PANDEY, R. K. et al. *Leishmania donovani*-Induced Increase in Macrophage Bcl-2 Favors Parasite Survival. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p.327-345, out. 2016.

PATRICK, D. A. et al. Synthesis of novel amide and urea derivatives of thiazol-2-ethylamines and their activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 11, p.2451-2465, jun. 2016.

PINK, Richard et al. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p.727-740, set. 2005.

POPSAVIN, M. et al. Synthesis and in vitro antitumour screening of 2-(β -d-xylofuranosyl)thiazole-4-carboxamide and two novel tiazofurin analogues with substituted tetrahydrofurodioxol moiety as a sugar mimic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p.6700-6704, nov. 2012.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p.98-114, ago. 2016.

RODRIGUES, J. F.; SOUZA, W. Ultrastructural Alterations in Organelles of Parasitic Protozoa Induced by Different Classes of Metabolic Inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, p.925-938, mar. 2008.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p.118, 1 mar. 2016.

SANTA-RITA, R. M et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 704-710, out, 2004.

SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. **Proceedings Of The National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p.11015-11022, set. 1999.

SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.324-333, mar. 2012.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471–478, Jul/set. 1994.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.55-59, mar. 2009.

SOUZA, L. C. K. et al. Actin expression in Trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p.631-636, ago. 2013.

TOLEDO, J. S. et al. Synthesis, cytotoxicity and in vitro antileishmanial activity of naphthothiazoles. **Chemical biology & drug design**, v. 81, n. 6, p. 749-756, jun, 2013.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v.87, n.2, p.87-89, fev. 2001.

VOULDOUKIS, I. et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p.860-865, abr. 1997.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p.2-13, jan. 2016.

ZELISKO, N. et al. Synthesis and antitrypanosomal activity of new 6,6,7-trisubstituted thiopyrano[2,3-d][1,3]thiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p.7071-7074, dez. 2012.

CAPÍTULO IV:

ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA DO DERIVADO TIAZÓLICO N-(1-METIL-2-METIL-PIRIDINA)-N'-(P-BROMOFENILTIAZOL-2-IL)-HIDRAZINA EM HAMSTER SÍRIO

Estudo da toxicidade oral aguda do derivado tiazólico N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina em hamster sírio

Vinícius V. G. Oliveira^{1,4*}, Mary A. A. Souza², Marcos V. O. Cardoso³; Ana Cristina L. Leite³, Regina C. B. Q. Figueiredo², Sebastião Rogério F. Silva⁴, Leucio Câmara Alves², Valdemiro A. Silva Junior⁵

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Autor para correspondência.

² Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

⁵Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil.

RESUMO

O tratamento contra a leishmaniose visceral (LV) em cães é longo, tedioso e frequentemente pode potencializar danos renais pré-existentes nos animais. Desta forma, é evidente a necessidade de um novo tratamento contra esta doença no qual as novas drogas sejam mais seguras e eficazes. Nesta perspectiva, as tiazooacetilpiridinas possuem promissora atividade leishmanicida com baixa toxicidade contra as células do hospedeiro. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade oral aguda de um derivado tiazólico em hamster sírio, investigando parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal bem como alterações estruturais em fígado e rins. Para a determinação da toxicidade oral aguda, o Método de “Toxicidade Aguda de Classe” foi realizado conforme o Guia OECD-423 em 9 fêmeas de hamster sírio saudáveis nulíparas e não prenhes, com idade entre 60 e 80 dias. Adicionalmente, foram realizados testes bioquímicos de parâmetros renais e hepáticos, bem como análises histopatológicas em rins e fígado. Com os resultados obtidos, foi observada que a DL₅₀ composto avaliado é de 1000 mg/Kg e classificado como categoria 4, segundo os critérios do protocolo experimental adotado. A análise bioquímica dos parâmetros de função hepática demonstrou que em todos os animais os valores encontrados estão acima dos valores de referência. Por sua vez, nos parâmetros que indicam injúrias aos rins, houve aumento comparado aos valores de referência em todos os animais na dosagem de ureia e diminuição na dosagem de albumina. Na creatinina, apenas um animal apresentou valor superior ao de referência. Quanto às lesões encontradas no fígado, foram descritas hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos, necrose de coagulação e presença de células mononucleares nos capilares sinusoides, esteatose e congestão de capilares sinusoides e veias centro-lobulares além de colestase. Os animais apresentaram lesões renais relacionadas à congestão de capilares glomerulares e intersticial, nefrose de túbulos contorcidos proximal e distal e congestão na região medular. Em conclusão, o derivado tiazólico testado foi bem tolerado oralmente embora tenha provocado lesões agudas no fígado e rins. Sendo assim, tais resultados em

conjunto, justificam pesquisas adicionais para investigação do potencial terapêutico deste composto *in vivo* com modelo crônico.

Palavras-chave: Toxicidade aguda; tiazól; avaliação hepática; avaliação renal

ABSTRACT

The treatment against visceral leishmaniasis (VL) in dogs is long, tedious and can often potentiate preexisting kidney damage in animals. Thus, the need for a new treatment against this disease in which the new drugs are safer and more effective is evident. In this perspective, thiazoacetylpyridines have promising leishmanicidal activity with low toxicity against host cells. The aim of this study was to evaluate the acute oral toxicity of a thiazolize derivative in Syrian hamster, investigating biochemical parameters of hepatic and renal evaluation as well as structural alterations in liver and kidneys. For the determination of acute oral toxicity, the "Acute Toxicity Class" method was performed according to Guide OECD-423 in 9 healthy nulliparous and non-pregnant healthy hamster hens aged between 60 to 80 days. In addition, biochemical tests of renal and hepatic parameters were performed, as well as histopathological analyzes in the kidneys and liver. With the results obtained, it was observed that the LD50 compound evaluated is 1000 mg/Kg and it is classified as category 4, according to the criteria of the experimental protocol adopted. Biochemical analysis of liver function parameters has shown that in all animals the values found were above the reference values. On the other hand, in the parameters that indicated kidney insults, there was an increase compared to the reference values in all the animals in the urea dosage and also a decrease in the albumin dosage. In creatinine dosage, only one animal presented a value higher than the reference one. As for the lesions found in the liver, hepatocyte hypertrophy and hyperplasia, coagulation necrosis and presence of mononuclear cells in the sinusoid capillaries, steatosis and congestion of sinusoid capillaries and central lobular veins were described, as well as cholestasis. The animals presented renal lesions related to congestion of glomerular and interstitial capillaries, proximal and distal convoluted tubule nephrosis and congestion in the medullary region. In conclusion, the thiazolize derivative tested was well tolerated orally although it caused acute lesions in the liver and kidneys. Therefore, all results together justify additional research to investigate the therapeutic potential of this compound *in vivo* with a chronic model.

Key words: Acute toxicity; thiazol; hepatic evaluation; renal evaluation

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas umas das mais importantes doenças negligenciadas, sendo classificada como doença de Classe I, ou seja, não controlada e emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (REZVAN e MOAFI, 2015). As duas são amplamente distribuídas nos cinco continentes, estimando-se que seja endêmica em 98 países (ALVAR et al., 2012). A cada ano, prevê-se que 500.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) (SOUTO et al., 2013) e 1.500.000 novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) (CORREA et al., 2014) ocorrerão globalmente. De acordo com registros da OMS, 350 milhões de pessoas vivem sob a ameaça das leishmanioses (DESJEUX, 2004). Porém, devido à falta de uma vacina eficaz em humanos (KUMAR e ENGWERDA, 2014), o impacto adverso do rápido aquecimento global (GONZALEZ et al., 2010), das alterações climáticas (READY, 2008), das guerras e dos movimentos migratórios (ALAWIEH et al., 2014; SHARARA e KANJ, 2014), pode haver mais pessoas acometidas pelas leishmanioses, o que é uma perspectiva assustadora.

Embora várias espécies silvestres possam ser potencialmente infectadas (LUPPI et al., 2008), o cão doméstico é o principal reservatório da LV no novo mundo, particularmente em áreas urbanas (REGUERA et al., 2016), onde a transmissão se dá pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae (KAMHAWI, 2006), particularmente a espécie *Lutzomyia longipalpis* (GALVIS-OVALLOS et al., 2017). Devido à vida doméstica destes animais, os cães são importantes no ciclo de infecção da doença para os seres humanos em áreas endêmicas, onde as condições climáticas permitem a presença de vetores (DANTAS-TORRES et al., 2012)

A quimioterapia atual contra a LV em cães foi desenvolvida há muitos anos, tendo como medicamentos de primeira linha os compostos antimoniais, miltefosina e alopurinol. Dentre as drogas de segunda linha, podem ser citados a domperidona, aminosidina (paromomicina), anfotericina B e pentamidina (REGUERA et al., 2016). No entanto, o tratamento é longo, tedioso e desagradável para cães e tutores. Além disso, os distúrbios renais são frequentemente associados tanto à doença como aos fármacos, o que pode exigir vigilância veterinária onerosa durante longos períodos de tempo (REGUERA et al., 2016; YASUR-LANDAU et al., 2016). Desta forma, é evidente a necessidade de um novo tratamento contra as leishmanioses no qual as novas drogas sejam mais seguras e eficazes.

Nesta perspectiva, os tiazóis apresentam um amplo espectro de atividade biológica, tais como atividades antitumoral (POPSAVIN et al., 2012), antibacteriana (LU et al., 2012), anti-inflamatória (SHAFI et al., 2012), antichagásico (NAVARRETE-VAZQUEZ et al., 2011) e mais recentemente, o seu potencial leishmanicida tem sido estudado (NAVA-ZUAZO et al., 2014). Compostos desta classe, como as tiazooacetilpiridinas, mais especificamente a N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-04) possuem promissora atividade leishmanicida. Além disso, vale ressaltar que se trata de uma atividade seletiva para *Leishmania infantum* com baixa toxicidade contra as células do hospedeiro (dados não publicados).

Em condições experimentais, a progressão da doença visceral depende da via de infecção, bem como da cepa utilizada de *Leishmania* sp. (HANDMAN, 2001). Vários estudos usando modelos experimentais murinos de LV foram desenvolvidos, mas nem todos mimetizam adequadamente a doença humana e canina. Por sua vez, humanos, cães e hamsters (*Mesocricetus auratus*) exibem sinais e sintomas similares durante a infecção visceral (HOMMEL et al., 1995; MELBY et al., 2001; REQUENA et al., 2000), enquanto camundongos geralmente apresentam poucos ou nenhum sinais clínicos (CARRION et al., 2006; NIETO et al., 2011). Camundongos BALB/c são tipicamente usados para estudar a doença na forma visceral devido à sua suscetibilidade. As infecções por *L. donovani* e *L. infantum* pode ser estabelecida com sucesso através da inoculação via intravenosa ou intradérmica em camundongos, contudo estas infecções não reproduzem as características da LV humana ou canina (NIETO et al., 2011). Por outro lado, infecção experimental de *L. infantum* em hamster reproduz muitos aspectos da doença canina e humana, tais como pancitopenia caracterizada por leucopenia, anemia, caquexia, hipergamaglobulinemia e ausência de resposta de células T (BUNN-MORENO et al., 1985; GIFAWESSEN e FARRELL, 1989; MATHIAS et al., 2001). Desta forma, o hamster tem sido o modelo mais adequado para a infecção experimental da LV (MOREIRA et al., 2016).

Diante destas considerações iniciais e dando continuidade à nossa pesquisa que concerne ao estudo da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de tiazóis sobre *L. infantum*, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade oral aguda de TAP-04 em hamster sírio, investigando parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e renal bem como alterações estruturais em fígado e rins.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DERIVADO TIAZÓLICO

Foi utilizado o derivado tiazólico N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina (TAP-04), onde a metodologia de síntese deste composto foi realizada a partir de reagentes químicos de alto grau de pureza descrita por Cardoso et al. (2014) (figura 1).

2.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 9 fêmeas de Hamster sírio saudáveis nulíparas e não prenhes, com idade entre 60 e 80 dias e com variação máxima de peso de 20% (100 ± 20 g). Os animais foram mantidos no biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) onde foram alocados individualmente em caixas de polipropileno, em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($55 \pm 5\%$), recebendo água potável e ração comercial Purina® *ad libitum*. O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, cujo protocolo experimental adotado foi previamente aprovado pela CEUA (nº 23076.021534/2015-86).

2.3 ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

Para a determinação da toxicidade oral aguda, o Método de “Toxicidade Aguda de Classe” foi realizado conforme o Guia Organization for Economic Co-operation and Development OECD-423 (OECD, 2001). Este método é um procedimento passo a passo que usa um pequeno número de animais e que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) e o número de animais por dose (3 Hamsters). A dose inicial selecionada para o estudo foi de 300 mg/Kg, definida a partir de estudos prévios no PROTOX - Prediction of Rodent Oral Toxicity, um “web server” para a previsão de toxicidades orais de moléculas em roedores (DRWAL et al, 2014). Este servidor é baseado em semelhanças químicas entre compostos com efeitos tóxicos conhecidos e a presença de fragmentos tóxicos. A próxima dose testada foi selecionada dependendo da mortalidade observada nas primeiras 24 horas de exposição. Após os testes, foi estimada a categoria toxicológica, segundo as especificações do Guia (figura 2).

O composto foi administrado em dose única por via oral utilizando agulha de gavagem em aço inox BD-10 (cânula diâmetro 1,0mm com esfera 1,7mm, raio de 40mm e comprimento de 31mm). Para a diluição da substância teste, foi utilizado Kolliphor® EL (Sigma-Aldrich) de modo que a concentração deste produto não ultrapassasse 5%. Para tal, os animais ficaram em jejum por 8 horas sem restrição hídrica. Após o período de jejum, os animais foram pesados e a substância administrada. A ração foi permitida 3 horas após a administração. Durante o período experimental, os animais foram observados individualmente após a dosagem, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas e depois, diariamente durante um total de 14 dias. Neste período, foram observados aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pelos, estresse, salivação, olhos, e comportamento.

No 14º dia, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando-se Pentobarbital (180 mg/Kg/IP) + Lidocaína (10 mg/mL/IP). Para avaliação do perfil bioquímico de enzimas renais e hepáticas, foi coletado sangue para obtenção de soro. Durante a necropsia, foram avaliados macroscopicamente os órgãos das cavidades torácica e abdominal quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência. Após avaliação macroscópica, fragmentos de fígado e rins foram destinados ao processamento histopatológico.

2.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras de soro obtidas foram submetidas aos testes pelo método cinético/colorimétrico em analisador semiautomático (THERMO PLATE) utilizando kits comerciais (Labtest®) para dosagem de fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina e albumina (FINCO, 1997).

Os valores de referência utilizados no trabalho foram os descritos por Spinelli et al., (2012) e Wolford et al., (1986).

2.5 HISTOPATOLOGIA

Após a coleta, o material foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram montados em lâmina e corados por Hematoxilina e Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003). Na análise histopatológica, os

fragmentos foram analisados e descritos de acordo com o tipo e grau de lesão observada em cada órgão.

3 RESULTADOS

A previsão de toxicidade oral aguda determinada no PROTOX foi de 300mg/Kg. Sendo assim, os testes foram iniciados nesta dosagem. Na menor dose, nenhum dos três animais expostos apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 horas após a exposição e durante o período do estudo. Desta forma, repetiu-se o teste nesta mesma dose com outros três animais, o que confirmou o resultado anterior. O teste foi então realizado na dose de 2000 mg/Kg, onde foi verificada mortalidade em dois animais testados nas primeiras 24 horas após exposição. O terceiro animal deste grupo sobreviveu todo o período experimental. Com os resultados obtidos, foi observada que a DL_{50} de TAP-04 é de 1000 mg/Kg e classificado como categoria 4, segundo os critérios do protocolo experimental adotado.

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade nos animais testados durante os 14 dias após a administração de TAP-04 na dosagem de 300mg/Kg. Por outro lado, os animais expostos à 2000mg/Kg, já na primeira hora após exposição, apresentaram-se com comportamentos alternados de excitação e sonolência. Entre a 3ª e 4ª hora após a exposição, um animal entrou em convulsão recobrando os sentidos após 15 minutos. Neste mesmo período, os outros dois animais apresentaram-se em estado de excitação. Na 5ª hora após exposição, um animal voltou a entrar em convulsão e morreu logo em seguida. Após nove horas da exposição, outro animal entrou em convulsão e foi a óbito. O animal sobrevivente apresentou comportamentos alternados de letargia e excitação nas primeiras 24 horas. Após 72 horas, não foram mais observados sinais clínicos de toxicidade neste animal.

Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal (Tabela 1) ou consumo de ração entre os animais das doses testadas (dados não mostrados).

Os animais testados do grupo de intoxicação aguda nas doses de 300mg/kg e 2000 mg/kg de TAP-04 tiveram seus resultados de parâmetros bioquímicos comparados com valores de referência, sendo constatadas alterações em muitos destes parâmetros avaliados (Tabela 2). A análise bioquímica dos parâmetros de função hepática demonstrou que em todos os animais os valores encontrados estão acima dos valores de referência. Por sua vez, nos parâmetros que indicam injúrias aos rins, houve aumento comparado aos valores de referência em todos os animais na dosagem de ureia e diminuição na dosagem de albumina. Na creatinina, apenas um animal apresentou valor superior ao de referência. Vale destacar que na dose de 2000 mg/Kg, houve análise bioquímica apenas do animal que sobreviveu aos 14 dias após exposição.

Nos exames histopatológicos dos grupos tratados com 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg foram observadas alterações estruturais hepáticas e renais (Tabelas 3 e 4). Quanto às lesões encontradas no fígado dos animais tratados com 300 mg/Kg, 100% (6/6) apresentaram hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos, necrose de coagulação, esteatose e congestão de capilares sinusoides e veias centro-lobulares; 50% (3/6) apresentaram presença de células mononucleares nos capilares sinusoides e colestase. Com relação aos animais tratados com 2000 mg/Kg, 100% (3/3) apresentaram hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos, necrose de coagulação, presença de células mononucleares nos capilares sinusoides e congestão de capilares sinusoides e veias centro-lobulares; 66,66% (2/3) apresentaram esteatose. Quando comparado entre os grupos, as lesões dos animais do grupo 2000 mg/Kg foram mais brandas (Figura 3).

Quanto às lesões renais, os animais submetidos a 300 e 2000mg/Kg apresentaram congestão de capilares glomerulares e intersticiais, hidropsia e nefrose de túbulos contorcidos proximal e distal e congestão na região medular. Um animal do grupo de 300 mg/Kg apresentou deposição de cálcio intra-tubular (Figura 4).

4 DISCUSSÃO

Os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006). Para que seus resultados sejam considerados pelas agências regulatórias dos países, é essencial que estes testes sejam conduzidos seguindo protocolos internacionalmente aceitos, como aqueles publicados pela OECD. No presente estudo, adotou-se o Guia OECD 423 (OECD, 2001), que apresenta boa reprodutibilidade, usa poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (Globally Harmonised System - GHS). O Guia OECD 423, juntamente com os Guias 420 e 425, substituiu o de número 401, introduzido há mais de 50 anos e banido definitivamente pela OECD em 2001 (VALADARES, 2006). Este último, altamente criticado pelas sociedades de proteção aos animais, determina estatisticamente a DL_{50} (dose que mata 50 % da população em estudo), a partir de estudos com grupos de animais (normalmente 20 animais de ambos os sexos por grupo) expostos a doses crescentes da substância em estudo.

A previsão de toxicidade de compostos é uma parte importante do processo de desenvolvimento de design de fármacos. As estimativas de toxicidade computacional não são apenas mais rápidas do que a determinação de doses tóxicas em animais, mas também podem ajudar a reduzir a quantidade de experimentos com animais conforme preconiza o princípio dos “3Rs” (RUSSEL e BURCH, 1992; DRWAL et al, 2014).

O presente estudo foi o primeiro que avaliou a toxicidade oral aguda de compostos tiazólicos em hamster sírios. Estudos conduzidos com complexo rutênio-areno-tiazóis em ratos também reportam uma baixa toxicidade aguda desta classe de compostos químicos (GROZAV et al., 2016). Estes autores identificaram que o complexo foi muito bem tolerado oralmente, com um valor de DL_{50} superior a 2000 mg/kg. Embora TAP-04 não possua um complexo metálico em sua estrutura para melhor comparação, ambos os resultados demonstram que complexos tiazólicos possuem baixa toxicidade em animais. Não foi realizada comparação com complexos tiazólicos sem metal por não ter sido encontrado na literatura tais informações. O uso de hamster no presente estudo justifica-se pelo fato deste animal ser considerado o modelo mais adequado para a infecção experimental da LV (MOREIRA et al., 2016) e TAP-04 será testada para avaliação de seu potencial leishmanicida nesta espécie.

As alterações no peso corporal têm sido utilizadas como um indicador de efeitos adversos das drogas e produtos químicos em animais testados (DESMARCHELIER et al.

1996). No ensaio de toxicidade oral aguda em hamsters sírios fêmeas, a dose de 300 mg/kg de TAP-04 não alterou de forma significativa a massa corporal, o que pode indicar a falta de toxicidade. Por sua vez, na dose de 2000mg/Kg, o único animal sobrevivente teve perda de massa corporal em 10%, sendo indicativo de presença de toxicidade.

Nas afecções agudas e crônicas do fígado, os níveis séricos de AST encontram-se aumentados, e também pode estar elevada em lesões musculares como traumatismos ou injeções intramusculares. Para se diferenciar o aumento de AST devido à lesão hepática ou muscular, usa-se o teste da enzima creatinaquinase (CK), que estará elevada, juntamente com a AST em casos de lesões musculares (TENNANT, 1997). A dosagem de CK não foi realizada nesse trabalho.

A fosfatase alcalina é uma fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FA, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar que pode ser induzida por medicamentos. Portanto, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamentos farmacológicos e em algumas condições patológicas. O aumento da atividade sérica de FA pode ocorrer em condições de colestase, intra e extrahepática, por indução com drogas ou hormônios, pela hiperatividade osteoblástica e em processos necróticos (WRIGHT e PLUMMER, 1974; MILLER e GONÇALVES, 1999). Como foi observado no presente estudo ocorreu um aumento médio de 40% e 91% na fosfatase alcalina nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg, respectivamente. Estes dados são reforçados pelos achados histopatológicos que indicam colestase nos animais tratados.

Várias enfermidades podem causar lesão de hepatócitos e extravasamento da ALT tais como hipóxia, alterações metabólicas que resultem em acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, drogas e substâncias químicas tóxicas, toxinas bacterianas, inflamação e neoplasia hepática (THRALL, 2007). Nos animais tratados com 300mg/Kg houve aumento médio de 153% e 64% comparado aos valores de referência de ALT e AST, respectivamente. Níveis elevados de ALT sugerem uma hepatite aguda e aumentos mais brandos podem sugerir doença hepatocelular crônica, cirrose, neoplasia ou hepatopatia por parasitos (TENNANT, 1997). Por outro lado, nos animais tratados com 2000mg/Kg houve aumento médio de 32% e 35% comparado aos valores de referência de ALT e AST, respectivamente. Estes resultados são condizentes com as análises histopatológicas, que demonstraram lesões mais brandas no animal que recebeu a maior dose.

Reações do hepatócito à agressão tóxica incluem tumefação celular e esteatose, acompanhada ou não de colestase. Em casos de intoxicação suficientemente grave isso pode progredir para necrose e insuficiência hepática (MACLACHLAN e CULLEN, 1998). Segundo YEH (2011), substâncias tóxicas podem provocar inflamação e degeneração gordurosa do fígado pela lesão de mitocôndrias, incapacitando o fígado de metabolizar adequadamente as gorduras, o que pode levar à destruição de células e inflamação. A elevação das enzimas AST e ALT nos animais testados demonstrou a presença de lesão hepática aguda, principalmente nos animais tratados com 300 mg/Kg. As análises histopatológicas reforçam os resultados bioquímicos, já que foi possível observar alterações estruturais condizentes com agressão tóxica, principalmente entre os animais tratados com a menor dosagem. Contudo, devemos ressaltar que os animais tratados com a maior dosagem tiveram lesões mais brandas. Isto pode ser explicado porque o primeiro animal deste grupo morreu na 5ª hora após exposição não tendo tempo suficientemente hábil para o desenvolvimento de lesões mais severas além da congestão de capilares sinusoides. Já o animal que demorou mais 4 horas para morrer, começou a já apresentar esteatose e hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos, sendo sugestivo de processo tóxico. Surpreendente foi o fato do animal que sobreviveu todo o período experimental na maior dosagem não ter apresentado lesões muito graves, podendo esta ser uma peculiaridade deste único animal. Como o teste OECD 423 não preconizava o uso de mais animais na dose de 2000 mg/Kg, alterações estruturais mais significativas podem ter deixado de ser observadas nesta dosagem. De acordo com MacLachlan e Cullen (1998), a morfologia da lesão hepática induzida por toxinas varia consideravelmente com o tipo, dose e a duração da exposição à toxina.

A ureia, o produto final do metabolismo proteico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001). Por sua vez, a creatinina é, teoricamente, a mais indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a ureia (STEVEN e SCOTT, 2002). A elevação nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina fornecem indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico (VIJAYALAKSHMI et al., 2000; ADEBAYO et al., 2003; DANTAS et al., 2006). No presente estudo, observou-se um aumento nos níveis séricos de ureia e presença de congestão de capilares glomerulares e intersticial, nefrose de túbulos contorcidos proximal e distal e congestão na região medular de todos os animais de ambos os grupos. O glomérulo é o local

inicial da exposição a substâncias químicas dentro do néfron, e uma série de nefrontoxicantes podem produzir lesões neste local. Em certos casos, os produtos químicos alteram a permeabilidade glomerular às proteínas (KLAASSEN, 2007). A hipoalbuminemia que todos os animais apresentaram é decorrente da diminuição da capacidade de filtração glomerular (BUSH, 2004). Dessa forma, pode-se sugerir que há sobrecarga renal mesmo na menor dose avaliada.

A dosagem de TAP-04 que deveria ser utilizada como substância leishmanicida de acordo com o protocolo da OECD seria 10% da DL_{50} (100 mg/Kg). Contudo, as lesões hepáticas e renais observadas em dose única de 300 mg/Kg permite reavaliar a dose considerada terapêutica, para um futuro tratamento de hamster sírio infectado experimentalmente com *L. infantum*. Levando em consideração que este modelo experimental se assemelha ao homem e ao cão no aparecimento insidioso das lesões, e que estas ocorrem em fígado e rins, se faz necessária reavaliação da dose terapêutica. Esta, por sua vez, deverá ser compatível com a função hepática e renal previamente observada nos animais infectados, de tal maneira que estes possam receber tratamento diário via oral. Portanto, a dose de segurança que pode ser estipulada para tratamento crônico seria de 1% (10mg/Kg) e 10% da DL_{50} com o objetivo de determinar a DE_{50} (dose capaz de produzir efeito farmacológico em 50% dos animais).

5 CONCLUSÃO

O derivado tiazólico TAP-04 foi bem tolerado oralmente sendo classificado na categoria 4 para a toxicidade oral aguda (DL_{50} de 1000 mg/Kg). Embora tenha tido excelente classificação no critério utilizado, a dosagem de 300 mg/Kg provocou lesões agudas no fígado e rins. Sendo assim, tais resultados em conjunto, justificam pesquisas adicionais para investigação do potencial terapêutico deste composto *in vivo* com modelo crônico.

Tabela 1. Média do peso corporal (gramas $\pm$ desvio padrão) de fêmeas de hamster sírio oralmente expostos à TAP-04 nas doses de 300 e 2000 mg/kg.

	300mg/Kg – 1	300mg/Kg – 2	2000mg/Kg
Dia 0	101,8 $\pm$ 1,5	105,3 $\pm$ 3,2	113,6 $\pm$ 6,4
Dia 7	104,8 $\pm$ 3,5	108,4 $\pm$ 4,8	113,3
Dia 14	103,9 $\pm$ 3,4	108,9 $\pm$ 3,9	108,1

Tabela 2. Valores das dosagens séricas de AST, ALT, FA, ureia, creatinina e albumina em hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e valores de referência descritos na literatura.

Animais	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Albumina (g/dL)
300-1	71,285	117,793	142,632	75,479	0,385	2,546
300-2	63,392	61,953	127,477	68,917	0,765	2,053
300-3	78,768	70,136	133,745	62,94	0,401	2,525
300-4	47,206	89,468	129,392	63,73	0,346	2,08
300-5	77,509	166,079	135,229	64,735	0,537	2,559
300-6	75,621	148,455	147,47	67,051	0,258	2,453
2000-1	57,008	57,637	186,761	69,004	0,469	2,297
Valores de referência	22 – 42	19 – 43	48 – 97	16 - 25	0,3 - 0,6	10 – 16

Tabela 3. Intensidade das alterações estruturais encontradas em fígado de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg

Animais	HHH	NC	EST	CM	CCS	CL
300-1	2	1	1	0	1	0
300-2	2	2	3	0	1	1
300-3	3	3	3	0	2	1
300-4	3	3	3	2	2	0
300-5	3	2	3	2	2	0
300-6	2	2	3	1	2	2
2000-1	2	1	1	1	1	0
2000-2	2	1	1	1	2	0
2000-3	3	1	0	1	2	0

0: Sem alteração

1: alteração descrita de forma discreta

2: alteração descrita de forma moderada

3: alteração descrita de forma intensa

HHH: Hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos

NC: Necrose de coagulação

EST: Esteatose

CM: Células mononucleares nos capilares sinusoides

CCS: Congestão de capilares sinusoides e veias

CL: Colestase

Tabela 4. Intensidade das alterações estruturais encontradas em rins de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg

Animais	CG	CI	NT	CM	CI
300-1	3	2	1	3	0
300-2	3	2	2	2	0
300-3	2	3	1	3	0
300-4	2	3	2	2	1
300-5	3	2	2	2	0
300-6	1	1	2	3	0
2000-1	2	2	2	2	0
2000-2	2	2	2	3	0
2000-3	3	2	1	3	0

0: Sem alteração

1: alteração descrita de forma discreta

2: alteração descrita de forma moderada

3: alteração descrita de forma intensa

CG: Congestão glomerular

CI: Congestão intersticial

NT: Nefrose dos túbulos contorcidos proximais e distais

CM: Congestão na região medular

CI: Deposição de cálcio intratubular

Figura 1. Estrutura química de N-(1-metil-2-metil-piridina)-N'-(p-bromofeniltiazol-2-il)-hidrazina.

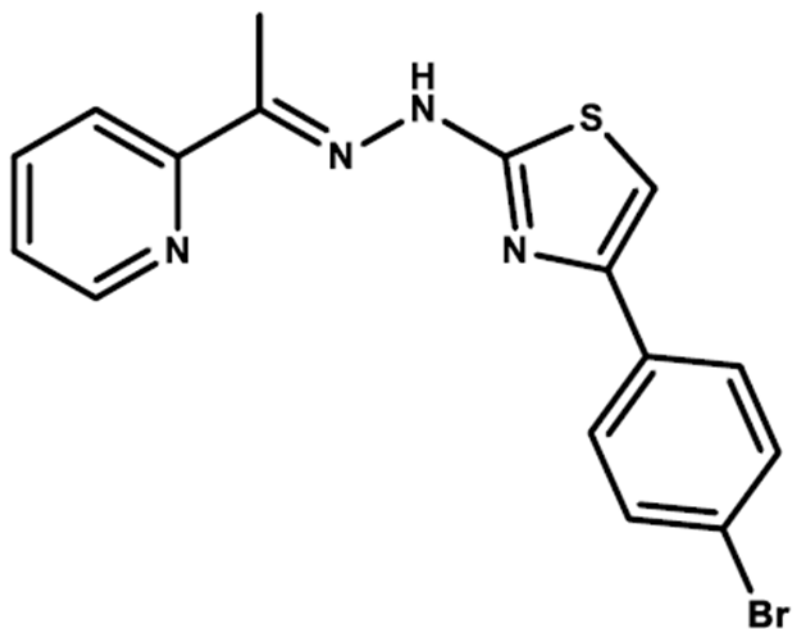


Figura 2. Etapas para o procedimento da toxicidade aguda, iniciando pela dose de 300mg/kg e usando 3 fêmeas por etapa, de acordo com o método “Toxicidade Aguda de Classe” baseado no Guia da OECD 423, 2001.

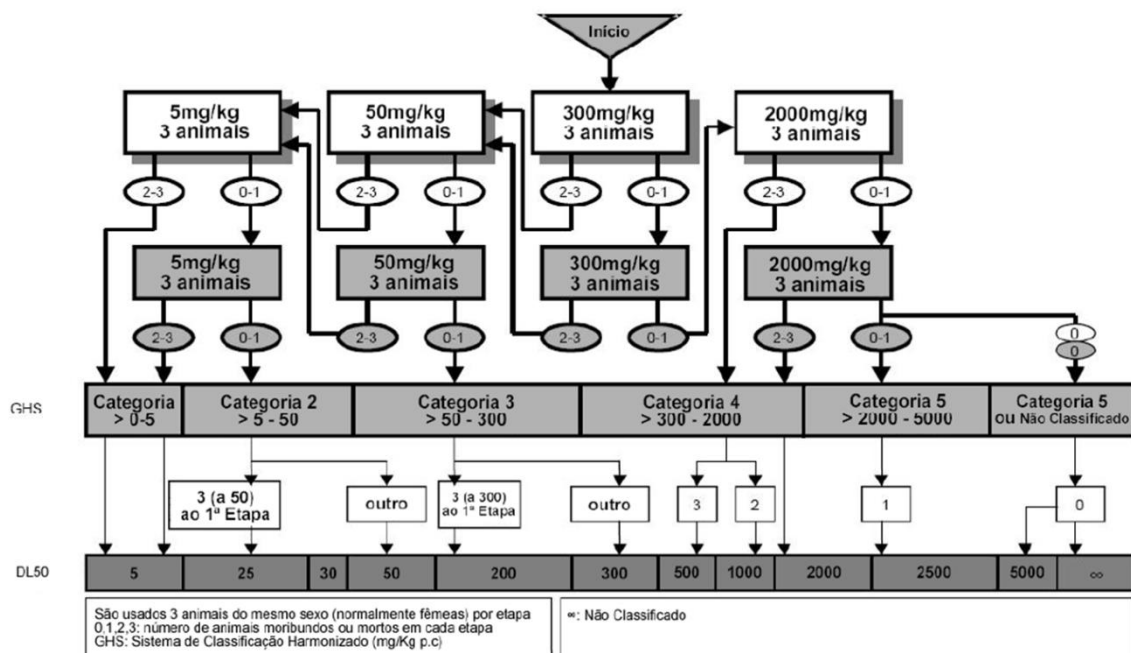


Figura 3. Alterações estruturais encontradas em fígados de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg. **A:** Grupo 300 mg/Kg. Hipertrofia de cordão de hepatócitos de intensidade moderada (cabeça de seta) com início de processo de esteatose (seta) e discreta congestão dos capilares sinusoides (estrela). HE. Barra = 50µm. **B:** Grupo 300 mg/Kg. Esteatose de grau intenso (seta) com discreta congestão de capilares sinusoides (estrela) e hipertrofia de hepatócitos (cabeça de seta). HE. Barra = 50µm. **C:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que morreu nas primeiras 24 horas. Presença de congestão (estrela) com hepatócitos balonosos (cabeça de seta) e núcleos picnóticos (seta). Detalhe: hepatócito hipertrofiado com início de vacuolização citoplasmática. HE. Barra = 50µm. **D:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que sobreviveu todo o período experimental. Presença de hepatócitos hipertrofiados (cabeça de seta) e congestão de veia centro-lobular (estrela). Detalhe: proliferação de hepatócitos e células binucleadas. HE. Barra = 50µm.

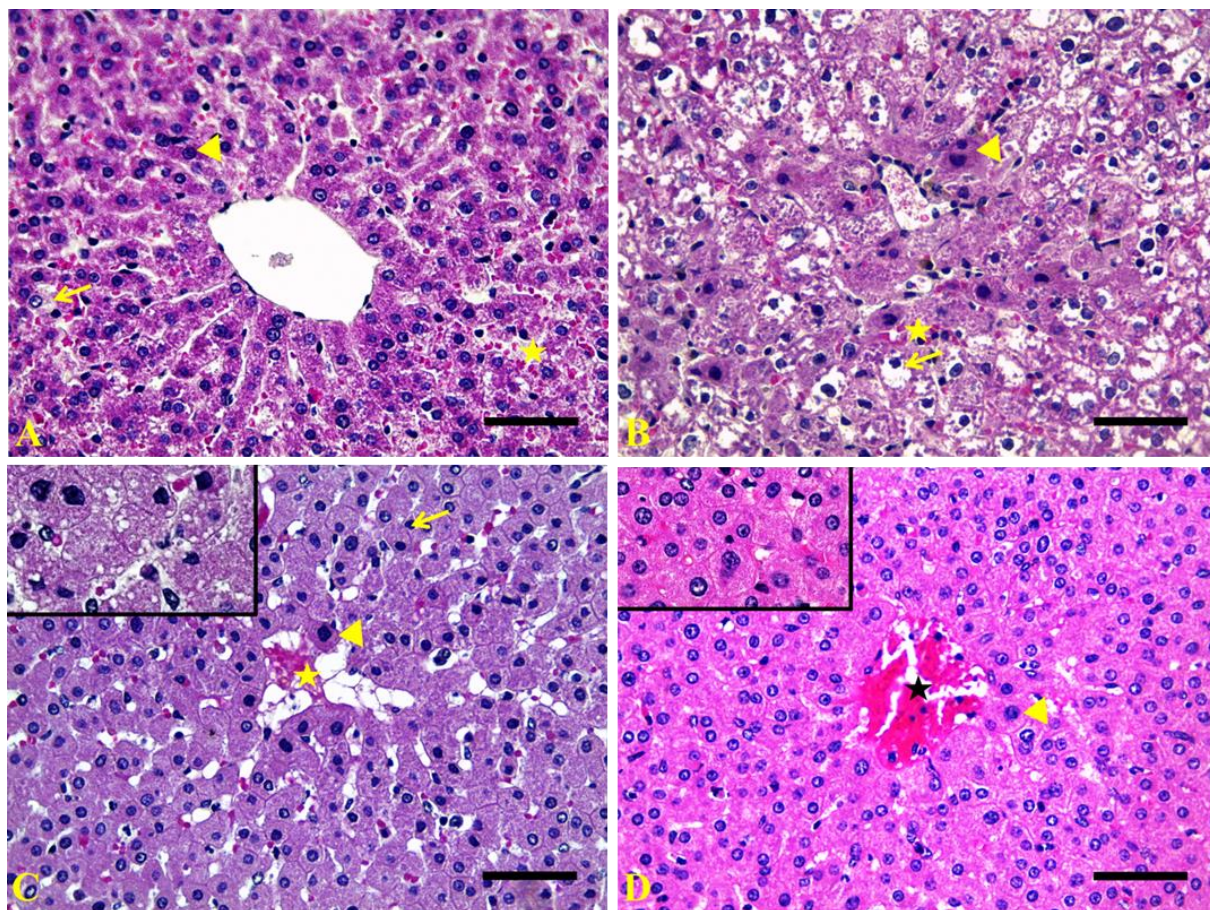
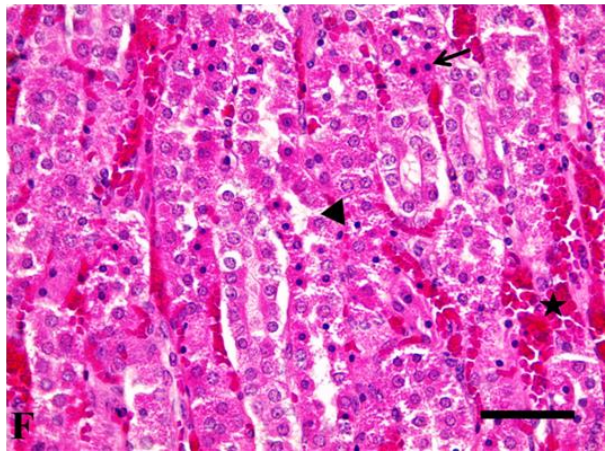
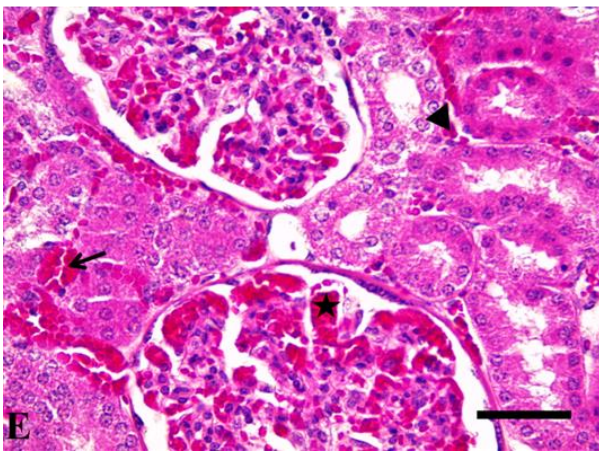
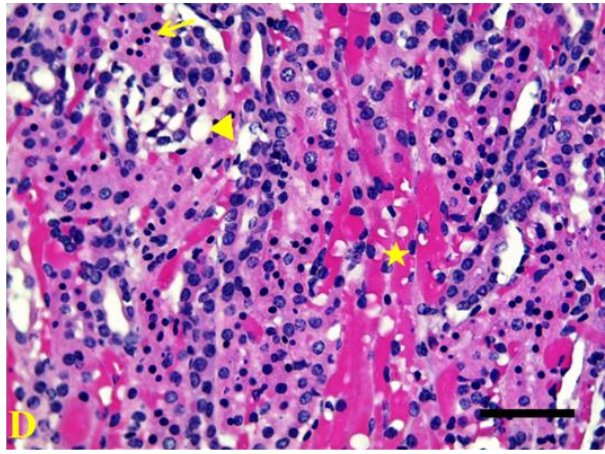
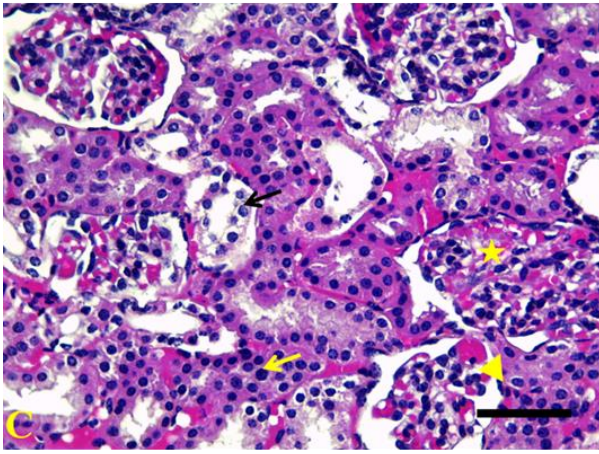
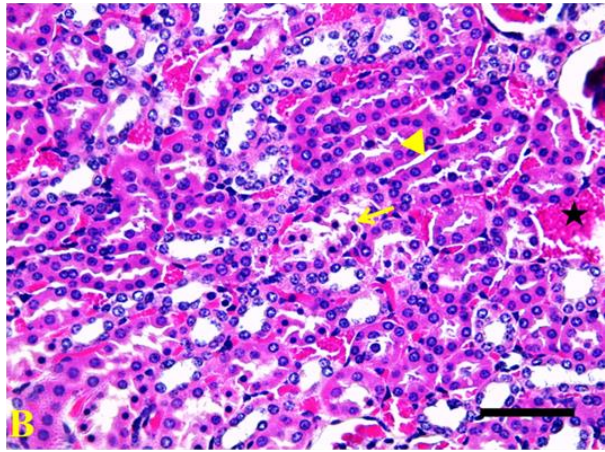
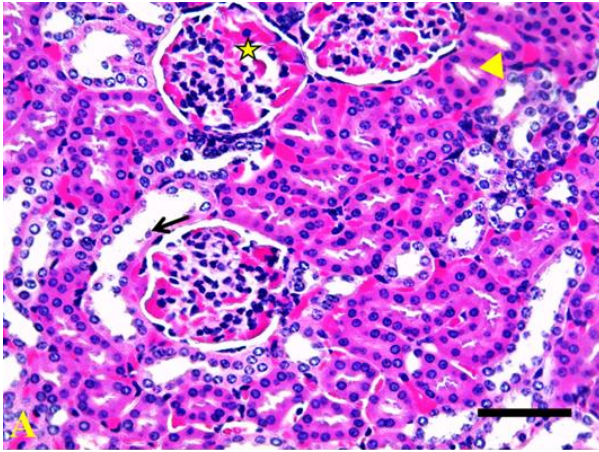


Figura 4. Alterações estruturais encontradas em rins de hamsters sírios adultos fêmeas tratados com TAP-04 nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg. **A:** Grupo 300 mg/Kg. Congestão glomerular (estrela) com nefrose de túbulo contorcido distal (seta) e hidropsia celular de túbulos (cabeça de seta). HE. Barra = 50µm. **B:** Grupo 300 mg/Kg. Congestão intersticial na região medular (estrela) com nefrose (seta) e hidropsia celular (cabeça de seta) de túbulos renais. HE. Barra = 50µm. **C:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que morreu nas primeiras 24 horas. Atrofia glomerular com congestão (cabeça de seta). Observar nefrose de túbulos contorcidos distais (seta) e congestão intersticial (estrela), bem como a presença de hidropsia celular de túbulos (seta amarela). HE. Barra = 50µm. **D:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que morreu nas primeiras 24 horas. Congestão intersticial na região medular (estrela). Observar túbulos renais com células picnóticas (seta) e vacuolização das células epiteliais dos túbulos (cabeça de seta). HE. Barra = 50µm. **E:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que sobreviveu todo o período experimental. Congestão glomerular (estrela) e intersticial (seta) com início de nefrose (cabeça de seta). HE. Barra = 50µm. **F:** Grupo 2000 mg/Kg – animal que sobreviveu todo o período experimental. Congestão intersticial na região medular (estrela), túbulos renais com células picnóticas (seta) e início de nefrose de túbulo renal (cabeça de seta). HE. Barra = 50µm.



REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, J.O. et al. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p.69-72, set. 2003.
- ALAWIEH, A. et al. Revisiting leishmaniasis in the time of war: the Syrian conflict and the Lebanese outbreak. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p.115-119, dez. 2014.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PlosOne**, v. 7, n. 5, e.35671, 31 maio 2012.
- BUNN-MORENO, M.M. et al. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clinical and experimental immunology**, v. 59, n.2, p.427-434, fev. 1985.
- BUSH, B.M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo:1ª. ed. Rocca, p.376, 2004.
- CARDOSO, M. V.O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p.48-59, out. 2014.
- CARRION, J. et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, , v. 28, n. 5, p.173-183, maio 2006.
- CORREA, E. et al. Leishmanicidal and trypanocidal activity of *Sapindus saponaria*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 4, p. 311-323, jul. 2014.
- DANTAS, J.A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Science** 2006, v.28, n.2, p.165-70, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends In Parasitology**, v. 28, n. 12, p.531-538, dez. 2012.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p.305-318, set. 2004.

DESMARCHELIER, C. et al. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 2, p.91-96, fev. 1996.

DRWAL, M.N. et al. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p.w53-58, 16 maio 2014.

FINCO, D.R. In: Kaneko, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. California: Academic Press, 916 p, 1997.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n. 2, p.10-20, 2017.

GIFAWESEN, C.; FARRELL J.P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. **Infection and Immunity**, v.57, n.10, p.3091-6, nov. 1989.

GONZALEZ, C. et al. Climate change and risk of Leishmaniasis in North America: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n.1, e585, jan. 2010.

GROZAV, A. et al. Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p.233-240, out. 2016.

HANDMAN, E.. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p.229-243, 1 abr. 2001.

HOMMEL, M. et al. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 89, n. 1, p.55-73, dez. 1995.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p.439-445, set. 2006.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7.ed. Portugal: Mc Graw-Hill, 2007.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, e.13, 14 mar. 2014.

LU, X. et al. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. Part 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.164-171, mar. 2012.

LUPPI, M.M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, n. 1-2, p. 146–151, 2008.

MACLACHLAN, N. J., CULLEN, J. M. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino. In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. Patologia Veterinária Especial. 2.ed. Artmed, São Paulo, p.95-131, 1998.

MATHIAS, R. et al. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 4, p.539-543, abr. 2001.

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. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p.1912-1920, 1 fev. 2001.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; p.607, 1999.

MOREIRA, N. D. et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p.181, 31 mar. 2016.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G. et al. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p.3168-3171, maio 2011.

NAVA-ZUAZO, C. et al. 2-Acylamino-5-nitro-1,3-thiazoles: Preparation and in vitro bioevaluation against four neglected protozoan parasites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p.1626-1633, mar. 2014.

NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p.39, 2011.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **OECD 423. Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

- POPSAVIN, M. et al. Synthesis and in vitro antitumour screening of 2-(β -d-xylofuranosyl)thiazole-4-carboxamide and two novel tiazofurin analogues with substituted tetrahydrofurodioxol moiety as a sugar mimic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p.6700-6704, nov. 2012.
- READY, P.D. Leishmaniasis emergence and climate chang. **Revue scientifique et technique**, n. 27, v.2, p. 399–412, ago 2008.
- REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p.98-114, ago. 2016.
- REQUENA, J. M. et al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, n. 3-4, p.269-281, out. 2000.
- REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: a narrative review article. **Veterinary Research Forum**, n. 6, v.1 p. 1–7, mar. 2015.
- RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992.
- SHAFI, S. et al. Synthesis of novel 2-mercapto benzothiazole and 1,2,3-triazole based bis-heterocycles: Their anti-inflammatory and anti-nociceptive activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p.324-333, mar. 2012.
- SHARARA, S. L.; KANJ, S. S.. War and Infectious Diseases: Challenges of the Syrian Civil War. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 11, p.585, 13 nov. 2014.
- SCHOSSLER, D. et al. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e ketoprofen durante o trans e pós-operatório. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, n. 1, p.46-51, mar. 2001.
- SOUTO, D. E.P. et al. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p.22-29, ago. 2013.
- SPINELLI, M.O. et al. Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério da Faculdade de Medicina da USP. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, vol. 1, n. 1, p.76-81, 2012.

STEVEN, L.S.; SCOTT M.S. **Urinary sistem**. In: Fundamentals of veterinary clinical pathology. Iowa: Iowa State; p. 277-336, 2002.

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed., Ed Roca, p.582, 2007.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. London: Academic Press, p.327-352, 1997.

TOLOSA, E.M.C. et al. **Manual de técnicas histológicas normal e patológica**. São Paulo: Manole, p.331, 2003.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL 50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.

VIJAYALAKSHMI, T. et al. . Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug–milk extract of *Semecarpus anacardium* Nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p.9-15, jan. 2000.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in Leishmania infantum from Dogs with Disease Relapse. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p.2-13, jan. 2016.

YEH, M. M., **Nonalcoholic Fatty Liver Disease**, in: Saxena, R., Pratical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach, Elsevier, Philadelphia, p. 435-440, 2011.

WRIGHT, P. J.; PLUMMER, D. T. The use of urinary enzyme measurements to detect renal damage caused by nephrotoxic compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 1, p.65-73, jan. 1974.

WOLFORD, S. T. et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 18, n. 2, p.161-188, jan. 1986.

CONCLUSÕES GERAIS

- Embora até o presente momento as políticas públicas de controle levem em consideração apenas a transmissão da LV por flebotomíneos, outras vias podem ter importância epidemiológica, particularmente em áreas livres de vetores biológicos. Dentre os modos de transmissão pesquisados atualmente, destacam-se a via sexual e a via vertical. Outros vetores biológicos como ectoparasitos de cães ainda necessitam de confirmação quanto ao papel que desempenham no ciclo de propagação da doença. Quanto à transfusão sanguínea, faz-se necessário rigoroso monitoramento de cães doadores de sangue para prevenir a infecção por *L. infantum*.
- A passagem de *L. infantum* de uma fêmea para o embrião pode ocorrer nos primeiros dias de prenhez. Por conseguinte, esta via de transmissão necessita ser levada em consideração no que se diz respeito à propagação da infecção em cães. Finalmente, esta é a primeira detecção de *L. infantum* infectando um embrião canino.
- Os resultados demonstraram que os compostos tiazólicos da série de tiazopiridinas (TP) e tiazacetilpiridinas (TAP) possuem promissora atividade leishmanicida. Além disso, vale ressaltar que trata-se de uma atividade seletiva para *L. infantum* com baixa toxicidade contra as células do hospedeiro.
- O derivado tiazólico TAP-04 foi bem tolerado oralmente sendo classificado na categoria 4 para a toxicidade oral aguda (DL₅₀ de 1000 mg/Kg). Embora tenha tido excelente classificação no critério utilizado, a dosagem de 300 mg/Kg provocou lesões agudas no fígado e rins. Sendo assim, tais resultados em conjunto, justificam pesquisas adicionais para investigação do potencial terapêutico deste composto *in vivo* com modelo crônico.

APÊNDICE A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

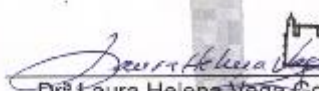
Certificamos que o projeto intitulado: **Análise *in vitro* e *in vivo* do potencial de novos compostos sobre tripanossomatídeos patogênicos.**

Protocolado sob nº 39/2012 pelo (a) pesquisador (a) Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 08/06/2013. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 31/dezembro/2016.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos (<i>Mus musculus</i>) Albino	
Swiss machos	288
Camundongos (<i>Mus musculus</i>)	
BALB/c machos	1164
Coelhos Nova Zelândia machos	06

We certify that project entitled **Análise *in vitro* e *in vivo* do potencial de novos compostos sobre tripanossomatídeos patogênicos.** Protocol nº 39/2012, coordinated by Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on June, 08, 2013. In present version this project is licensed and valid until December, 31, 2016.

Recife (PE, Brazil) June, 10, 2013.


 Dra Laura Helena Vega Gonzáles Gil
 Coordenadora CEUA/CPqAM

DRA. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais - CEUA
 Tel. (51) 3453-1911
 E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM / FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.870-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE B



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de junho 2015.

Ofício nº 55/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Vinicius Vasconcelos Gomes de Oliveira
Centro Acadêmico de Vitória - CAV
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 021534/2015-86

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Vias de Transmissão da Leishmaniose Visceral Americana e Tratamento de Hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados por *Leishmania infantum***".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Aggeu Magalhães;
Animais; Hamster; Linhagem; SYR; Idade; 60 dias;
Peso; 100g; Sexo; (15) fêmea e (35); Nº total de
Animais; 80.

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carei;
Presidente da CEUA / CCB - UFPE;
SIAPE 1801584

APÊNDICE C

Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.9, p.1622-1628, set, 2015
ISSN 0103-8478

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141368>

PARASITOLOGY

Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals

Vias de transmissão da leishmaniose visceral em mamíferos

Vinícius Vasconcelos Gomes de Oliveira^{1*} Leucio Câmara Alves^{1†}
Valdemiro Amaro da Silva Junior¹

– REVIEW –

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic disease caused by *Leishmania infantum*. The major sites of parasite localization in infected animals are the secondary lymphoid organs, bone marrow and cutaneous tissue. However, reports exist on the detection of the parasite in the organs of the male and female genital system. The main route of transmission is related to the hematophagous sandfly vectors of the genus *Lutzomyia* (New World) and *Phlebotomus* (Old World). However, other routes of transmission may be mentioned, such as sexual, vertical, hematogenic without vector and others involved in VL epidemiology. Thus, the current article reviews the main forms of transmission of visceral leishmaniasis in mammals.

Key words: *Leishmania* sp., dogs, sexual transmission, vertical transmission.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os principais sítios de localização do parasito nos animais acometidos pela LV foram órgãos linfóides primários, secundários e tegumento. Contudo, existem relatos da detecção do parasito em órgãos do sistema genital masculino e feminino. A principal via de transmissão decorre da ação hematofaga de vetores flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Todavia, outras formas de transmissão podem ser relacionadas, como as vias sexual, vertical, hematogênica não vetorial e ainda existe a possibilidade de outros vetores estarem envolvidos na epidemiologia da doença. Dessa forma, a proposta deste artigo foi revisar as principais formas de transmissão da leishmaniose visceral em mamíferos.

Palavras-chave: *Leishmania* sp., cães, transmissão sexual, transmissão vertical.

INTRODUCTION

VL is an important parasitic zoonosis and domestic dogs are the main reservoir of the disease, particularly in urban areas (DINIZ et al., 2008). It is caused by *Leishmania infantum* (synonym to *L. chagasi*) with tropism for the mononuclear phagocyte system (NEVES, 2005; CHAPPUIS et al., 2007).

The disease is usually transmitted by the hematophagous activities of sandflies belonging to the genera *Lutzomyia* (New World) and *Phlebotomus* (Old World) (MURRAY et al., 2005). However, alternative routes of transmission have been described in dogs and man (TURCHETTI et al., 2014). In dogs, there are reports of sexual (SILVA et al., 2009a) and vertical transmission (NAUCKE & LORENTZ, 2012), by blood transfusion (DE FREITAS et al., 2006) and by other vectors such as fleas and ticks which may be involved in the epidemiology of the disease (MORAIS et al., 2013).

Alternative routes of infection jeopardize the control strategies and eradication of VL based on vector elimination. In fact, they are inefficient since the parasite *L. infantum* would still maintain its lifecycle transmitted by the breeding of positive stray dogs (SILVA et al., 2009a).

Epidemiologically, infection in dogs is more prevalent than in man, and there is a large number of asymptomatic animals which host parasites in the dermis (BONATES, 2003). The VL in dogs is considered a chronic disease characterized

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Corresponding author.

[†]Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

APÊNDICE D

Ciência Rural, Santa Maria, v.47: 01, e20160553, 2017

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160553>

ISSN 1678-4596

PARASITOLOGY

Molecular evidence of early vertical transmission of
Leishmania (Leishmania) infantum in a dog

Vinicius Vasconcelos Gomes de Oliveira^{1,2} Rafael Antonio Nascimento Ramos³
Carlos Alberto do Nascimento Ramos³ Neurisvan Ramos Guerra¹ Frederico Celso Lyra Maia⁴
Leucio Câmara Alves¹ Valdemiro Amaro da Silva Junior⁴

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-900, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, Brasil. E-mail: vinicius-vasconcelos@hotmail.com. *Corresponding author.

²Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Garanhuns, PE, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

⁵Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

ABSTRACT: Visceral leishmaniasis (VL) is caused by the protozoan *Leishmania infantum*. Transmission of this parasite to hosts occurs mainly through the bite of infected sand flies. However, alternative infection routes have been hypothesized, especially in areas where the biological vector is absent. The exact time of infection and whether in utero transmission occurs have still not been fully elucidated. This report demonstrates molecular evidence of vertical transmission of *L. infantum* from a pregnant dog to the embryo. Samples (e.g. vulva, vagina, cervix, uterine body, uterine horn and ovaries) from a female naturally infected by *L. infantum* and from her embryo were molecularly analyzed by means of qPCR and cPCR followed by DNA sequencing. The gestational age was estimated to be 23±1 day. Through qPCR, the presence of *L. infantum* DNA was detected in all the samples analyzed (n=7), including the embryo, conversely through cPCR, only four samples (vagina, cervix, uterine body and embryo) were positive. This study demonstrated that transmission of *L. infantum* from a pregnant dog to the embryo might occur in the early days of pregnancy. In conclusion, this is the first report showing *L. infantum* infecting a canine embryo.

Key words: leishmaniasis, dog, vertical infection, embryo.

Evidência molecular da transmissão vertical precoce de
Leishmania (Leishmania) infantum em um cão

RESUMO: Leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. A transmissão deste parasito para hospedeiros é principalmente vetorial. No entanto, rotas alternativas de infecção têm sido investigadas, especialmente em áreas onde o vetor biológico está ausente. O período exato de infecção e se a transmissão in utero ocorre ainda não está totalmente elucidada. Este estudo demonstra uma evidência molecular da transmissão vertical de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião. As amostras (vulva, vagina, cervix, corpo do útero, corno do útero e ovários) de uma fêmea naturalmente infectada por *L. infantum* e de seu embrião foram analisados molecularmente por meio de qPCR e cPCR, seguido de sequenciamento de DNA. A estimativa da idade gestacional foi de 23±1 dia. Na qPCR, a presença de DNA de *L. infantum* foi detectado em todas as amostras (n=7) analisadas, incluindo o embrião. No entanto, na PCR convencional, apenas quatro amostras (vagina, cervix, corpo do útero e embrião) foram positivas. Este estudo demonstrou que a transmissão de *L. infantum* de uma cadela prenhe para o embrião pode ocorrer nos primeiros dias de prenhez. Em conclusão, de acordo com o conhecimento dos autores, este é o primeiro relatório evidenciando infecção de embrião canino por *L. infantum*.

Palavras-chave: leishmaniose, cão, infecção vertical, embrião.

Visceral Leishmaniasis is an important parasitic disease that affect mammals and is primarily transmitted by insect vectors belonging to the sub-family *Phlebotominae*. Nonetheless, alternative transmission routes among dogs have been hypothesized in VL (OLIVEIRA et al., 2015). For instance, involvement of ticks in the transmission of *Leishmania infantum*, especially *Rhipicephalus*

sanguineus sensu lato, was first demonstrated in France in the 1930s, through observation of the ability of these ticks to mechanically transmit the protozoan to rodents (BLANC & CAMINOPETROS, 1930). Similarly, the potential role of fleas has already been assessed (FERREIRA et al., 2009), but the real role of these ectoparasites in the epidemiology of *L. infantum* remains a matter of controversy.

Received 06.06.16 Approved 08.11.16 Returned by the author 10.28.16
CR-2016-0553.R1