

Juliana Barbosa Nunes

**Avaliação da atividade anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*
de compostos fenólicos em hamster dourado.**

São Paulo

2021

Juliana Barbosa Nunes

**Avaliação da atividade anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*
de compostos fenólicos em hamster dourado.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Dra Márcia Dalastra Laurenti

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Juliana Barbosa
Avaliação da atividade anti-Leishmania
(Leishmania) infantum chagasi de compostos fenólicos
em hamster dourado / Juliana Barbosa Nunes. -- São
Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Márcia Dalastra Laurenti.

Descritores: 1. Leishmaniose visceral
2. Tratamento 3. Carga parasitária 4. Biologia
molecular 5. Toxicidade 6. Farmacocinética

USP/FM/DBD-191/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*À minha família que sempre me incentivou à educação
como forma de nos tornar pessoas melhores e me deram
forças para nunca desistir dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e por poder estar sempre evoluindo no aprendizado.

A meus pais por desde muito cedo me incentivarem a tomar gosto pelo estudo, que mesmo diante de todas as dificuldades da vida, não mediram esforços para fazer o melhor por seus filhos. Em especial minha mãe pelas frequentes orações que me deram forças para persistir na caminhada.

A meu esposo Ricardo, com quem tenho o prazer de dividir a vida, que sempre me incentivou a buscar o meu melhor, me apoiando em todos os momentos e não me deixando jamais desistir. A pessoa que compartilha experiências desde antes da graduação, durante a pós-graduação e agora finalizando mais uma etapa do meu crescimento profissional.

A todos os demais familiares pela ausência em muitos eventos familiares devidos aos diversos experimentos e viagens.

À Dra Márcia Laurenti, por ter aceitado esse desafio comigo, sempre me tratando com amor, fazendo sentir um carinho do tipo materno, muito compreensiva em todos os aspectos. Só tenho a agradecer pelos ensinamentos, paciência, exemplo de profissional e de orientadora em um ambiente em que vemos muitos casos de pessoas que sofrem pressão excessiva dos seus orientadores, supervisores e que acabam adoecendo. Assim serei eternamente grata pela forma como me acolheu e me possibilitou desenvolver essa pesquisa e espero me espelhar em sua forma de tratar a todos os alunos. Obrigada pela amizade.

Ao Dr. Luiz Felipe Passero, pelos inúmeros conselhos e auxílios na pesquisa e nos experimentos. Agradeço muito por toda a contribuição desde o planejamento do projeto, desenvolvimento e com suas contribuições durante as bancas, bem como a amizade e carinho dedicada.

À Dra Aurea Favero, por sua imensa contribuição nas análises histopatológicas, seus ensinamentos e sua forma sempre gentil de tratamento e disponibilidade de tempo para tantas análises, meu muito obrigada.

Aos técnicos do serviço de histopatologia, que foram fundamentais para a excelência na qualidade do material processado.

Aos amigos do LIM-50 que me possibilitaram o suporte em muitos experimentos e amizade em todos os momentos, na hora do almoço, nas comilanças em datas

comemorativas, nos doces e queijos mineiros, agradeço a cada um que de sua forma particular me ajudou a conseguir os resultados e tornaram as idas a SP mais alegres e aconchegantes. Adriana, Carmen, Edson, Eduardo, Gabriela Araujo, Gabriela, Jéssica, Kadir, Karen, Thais Bruna, Thais, Willfredo, Dra Claudia, Dra Vânia e tantos outros que tive o prazer de conhecer.

À querida Lia Negrão, por me dar todo o suporte da parte de documentos, bem como nos presentear com aquele carinhoso bom dia e um cafezinho logo pela manhã, deixando os dias mais leves. Obrigada pela amizade, carinho e conversas ao longo de todo esse tempo.

À Thaise Tomokane, um anjo da guarda do laboratório, que sempre ajudou e deu apoio em muitos experimentos, procedimentos, desde antes de minha entrada no doutorado. Irei sempre me recordar de sua amizade e boa vontade em ajudar tanta gente.

À querida Amanda Ribas, que por muitas vezes me hospedou em sua casa, uma imensa gratidão por ter me acolhido e pela grande amizade.

Aos amigos de Minas Gerais, que me acompanham desde o mestrado na UNIFAL, agradecimento especial ao Dr. Marcos que confiou no meu potencial desde o mestrado, que esteve como um suporte durante o doutorado, meu eterno agradecimento por ter acreditado que eu conseguiria realizar tantas coisas em pouco tempo, pela amizade, pelo carinho e por estar sempre contribuindo em minha evolução.

Ao querido Dr Fabio Colombo, por me ajudar em tantos momentos, por toda sua contribuição técnica nos ensaios de PCR, pela paciência ao longo desses anos, por tantos ensinamentos em laboratório, na vida profissional de um pesquisador e também como um grande amigo.

À Dra Danielle Dias e Dra Daniela Chagas pelo fornecimento dos compostos para a realização desse estudo, bem como o suporte na área química.

À Dra Vanessa Boralli, e os alunos Thaila, Rodrigo e Lellis pela parceria nos experimentos de farmacocinética que engrandeceram esse trabalho. Meu agradecimento pela imensa paciência em me ensinar uma área que eu não tinha familiaridade, e aos alunos um muito obrigado pelas extensas horas de trabalho.

À Dra Maria Rita e André pelo suporte nas realizações dos experimentos bioquímicos.

À Dra Luciana Azevedo e as alunas Mariana e Caroline pela ajuda nos experimentos de toxicidade nos animais. Essa ajuda foi essencial para o sucesso desse experimento.

Aos alunos de graduação e pós-graduação da UNIFAL, que foram fundamentais para os experimentos *in vivo*, desde a ajuda na manutenção dos animais, à realização dos tratamentos, ajuda no processamento de amostras e também pela amizade durante todos esses anos. Aline, Patrícia, Joana, Fred, Yan, Paula, Ana Flávia, Lívia, Ana Laura, Gabriela, Carolina, Karla, Matheus e tantos outros que passaram pelo laboratório ao longo de todos esses anos.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aos funcionários envolvidos para que fosse possível a conclusão dessa pós-graduação, especialmente em tempos difíceis como estamos vivendo.

À CAPES pelo suporte financeiro e bolsa demanda social.

À FAPEMIG/CNPq/MS/SES-MG – Programa Pesquisa para o SUS – PPSUS, APQ-03701-17 pelo apoio financeiro.

A cada um que contribuiu de alguma forma, direta ou indiretamente para a realização dessa tese.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Aspectos gerais das leishmanioses	23
2.2 Ciclo	24
2.3 Vetores.....	26
2.4 Resposta imune.....	27
2.5 Alterações histopatológicas na LV	29
2.6 Tratamento disponível	30
2.7 Derivados de produtos naturais	31
2.8 Modelo <i>in vivo</i>	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivos gerais	37
4.2 Objetivos específicos.....	37
5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Obtenção dos compostos	39
5.1.1 Obtenção do HDAB	39
5.1.2.Obtenção do galato de etila	39
5.2 Experimentos <i>in vitro</i>	40
5.2.1 Atividade antipromastigotas	40
5.2.2 Determinação das interações entre os compostos <i>in vitro</i>	41
5.2.3 Determinação das Concentrações Inibitórias Fracionárias e classificação das associações.....	41
5.2.4 Infecção <i>in vitro</i>	43
5.2.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos <i>in vitro</i>	43
5.4 Ensaio farmacocinéticos	44
5.4.1 Aspectos Gerais	44

5.4.2 Reagentes.....	44
5.4.3 Equipamentos	45
5.4.4 Condições cromatográficas.....	45
5.4.5 Preparo da amostra	45
5.4.6 Linearidade	46
5.4.7 Curva de Calibração	47
5.4.8 Precisão e Exatidão Intra e Interdia.....	47
5.4.10 Análises farmacocinéticas	50
5.5 Experimentos <i>in vivo</i>	50
5.5.1 Extração de RNA de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> e síntese de cDNA	52
5.5.2 Determinação da carga parasitária no fígado e baço pela qPCR (Linj31).....	53
5.5.3 Avaliação da expressão relativa de citocinas por qPCR.....	54
5.6 Estudo histopatológico	56
5.7 Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i>	57
5.7.1 Testes bioquímicos	57
5.7.2 Análise de focos criptas aberrantes	57
5.7.3 Teste de micronúcleo em medula óssea	58
5.8 Análise estatística	59
6 RESULTADOS	60
6.1 Resultados <i>in vitro</i>	60
6.1.1 Avaliação da Atividade contra formas promastigotas	60
6.1.2 Determinação das interações entre os compostos <i>in vitro</i> contra promastigotas	60
6.1.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais	62
6.1.4 Avaliação da Atividade contra formas amastigotas intracelulares	63
6.2 Farmacocinética.....	64
6.3 Experimentos <i>in vivo</i>	66
6.3.1 Avaliação da carga parasitária.....	66
6.3.2 Avaliação da expressão de mRNA das citocinas IL-10; IL-4, TGF β , IFN- γ , IL-17 e TNF α	68
6.3.3 Histopatológico.....	76
6.3.3.1 Baço.....	76
6.3.3.2 Fígado	77
6.3.3.3 Rim	80
6.3.3.4 Pulmão	81
6.3.3.5 Coração.....	82

6.3.4.1 Ensaio bioquímico	85
6.3.4.1.1 Provas de função hepática	85
6.3.4.1.2 Provas de função renal.....	88
6.3.4.2 Focos de criptas aberrantes.....	89
6.3.4.3 Micronúcleos	92
7 DISCUSSÃO	94
7.1 <i>In vitro</i>	94
7.2 Farmacocinética.....	95
7.3 Carga parasitária.....	96
7.4 Resposta imune.....	97
7.5 Histopatológico.....	103
7.6 Ensaio bioquímico	107
7.7 Criptas aberrantes	110
7.8 Micronúcleo.....	111
ANEXO A	113
ANEXO B	114
8 REFERÊNCIAS	115
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CE ₅₀	Concentração Efetiva de 50%
CEUA	Conselho de Ética no Uso de Animais
CIF	Concentração inibitória fracionária
<i>Cl_{Tf}</i>	<i>Clearance</i> total aparente
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CV	Coefficiente de variação
DCs	Células dendríticas
DMH	1,2-Dimetilhidrazina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPR	Desvio padrão relativo
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
g	grama
GE	Galato de etila
h	horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDAB	2-Hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G

IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzível
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Kilograma
LC	Leishmaniose cutânea
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LDPK	Leishmaniose dérmica pós-Kalazar
LDU	<i>Leishman Donovan Units</i>
LIQ	Limite Inferior de Quantificação.
LMC	Leishmaniose mucocotânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
m/z	Massa/carga
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mm	milímetro
mM	miliMolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
MP	Megapixel
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazólio]
NCE	Eritrócitos normocromáticos
ng	nanograma
NK	Células Natural Killer
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCE	Eritrócitos policromáticos
PEG	Polietilenoglicol
pH	potencial de Hidrogênio
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ΣCIF	Somatória da concentração inibitória fracionária
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
t _{1/2}	Tempo de meia vida de eliminação
TGF-β	Fator de crescimento transformador Beta
Th1	Células T helper do tipo 1
TLRs	Receptores Tool-Like

tmáx:	Tempo máximo de concentração
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto
UI	Unidade Internacional
UPLC-MS/MS <i>spectrometer</i>	<i>Ultra performance liquid chromatography - tandem mass</i>
VO	via oral
ΔC_t	delta Ct
$\bar{x}\Sigma CIF$	Média da somatória da concentração inibitória fracionária

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de HDAB em plasma de hamster analisado em UPLC-MS/MS.....	48
Tabela 2 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de GE em plasma de hamster analisado em UPLC-MS/MS.....	49
Tabela 3 - Grupos de experimentos <i>in vivo</i>	51
Tabela 4 - Sequências de primers	55
Tabela 5 - Valores de CE ₅₀ em promastigotas.....	60
Tabela 6 - Valores de CE ₅₀ , CIFs, Σ CIF, $\bar{x}\Sigma$ CIF das associações entre HDAB e GE em promastigotas.....	61
Tabela 7 - Valores de CC ₅₀ em macrófagos peritoneais de hamsters	62
Tabela 8 - Valores de CC ₅₀ das associações entre HDAB e GE em macrófagos peritoneais de hamsters	63
Tabela 9 - Valores de CE ₅₀ em amastigotas intracelulares.....	63
Tabela 10 - Resumo dos resultados e índice de seletividade aos tratamentos.....	64
Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após a administração oral sem associação de HDAB (15mg/Kg) e GE (15mg/Kg), e a associação de GE (15mg/Kg) com HDAB (15mg/Kg) (n=6 por grupo). Mediana; intervalo de confiança de 95% (IC95%)...	65
Tabela 12 - Resumo das principais alterações histopatológicas encontradas nos grupos experimentais.....	84
Tabela 13 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em medula óssea de hamsters	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo das Leishmanioses.....	25
Figura 2- Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de Leishmania	26
Figura 3 - Fórmula química do HDAB	39
Figura 4 - Fórmula química do GE	40
Figura 5 - Curva padrão de promastigotas para o iniciador LinJ31	54
Figura 6 - Curvas de dose resposta de CE50 da associação entre HDAB e GE em promastigotas.....	61
Figura 7 - Isoblograma referente aos valores de CIF das combinações de HDAB e GE em promastigotas.....	62
Figura 8 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para HDAB com e sem associação	65
Figura 9 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para GE sem e com associação	66
Figura 10 - Expressão relativa de mRNA de citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β em baço de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas e grupo controle	71
Figura 11 - Expressão relativa de mRNA de IFN- γ , TNF- α e IL-17 em baço de hamsters infectados com formas promastigotas e amastigotas e grupo controle	72
Figura 12 - Expressão relativa de mRNA de citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β em fígado de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas e grupo controle	74
Figura 13 - Expressão relativa de mRNA de IFN- γ , TNF- α e IL-17 em fígado de hamsters infectados com formas promastigotas e amastigotas e grupo controle	75
Figura 14 - Níveis séricos de ALT de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle	86
Figura 15 - Níveis séricos de AST de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle	86
Figura 16 - Níveis séricos de AST de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle	87
Figura 17- Níveis séricos de GGT de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle	87

Figura 18 - Níveis séricos de Ureia de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle. Teste de Mann Whitney.	88
Figura 19 - Níveis séricos de Creatinina de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle. Teste de Mann Whitney.	89
Figura 20 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters do grupo controle.	90
Figura 21 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com DMH.	90
Figura 22 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com HDAB.	91
Figura 23 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 75/25.	91
Figura 24 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 50/50.	91
Figura 25 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 25/75.	92
Figura 26 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com GE.	92

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de baço de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais 67
- Gráfico 2** - Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais. NOTA: NT: grupo infectado não tratado; HDAB (100%); 75/25 (HDAB 75% + GE 25%); 50/50 (HDAB 50% + GE 50%); 25/75 (HDAB 25% + GE 75%); GE (100%); GLU: Glucantime. 68

RESUMO

Nunes JB. *Avaliação da atividade anti-Leishmania (Leishmania) infantum chagasi de compostos fenólicos em hamster dourado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A leishmaniose visceral é uma doença crônica, sistêmica e que quando não tratada, pode levar a óbito em um grande número de casos. A terapia disponível se baseia no uso de antimoniais pentavalentes, que são utilizados há mais de 50 anos e que apresentam casos de falhas no tratamento em alguns países. A busca por novas substâncias que se enquadrem nos padrões de segurança, é considerada como prioridade para o tratamento da doença. Assim, buscou-se avaliar a atividade anti-*Leishmania* utilizando os compostos 2-Hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona (HDAB) e galato de etila (GE) isolados e em combinação no contexto *in vitro*, e *in vivo* no modelo hamster dourado, infectados com formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Além da avaliação farmacocinética dos compostos isolados e em associação em animais não infectados. Foram analisadas às respostas ao tratamento *in vitro* em promastigotas e amastigotas desta espécie, assim como a citotoxicidade celular; no tratamento *in vivo* pela quantificação da carga parasitária pela qPCR no baço e fígado; análise da resposta imune pela expressão de citocinas por qPCR no baço e fígado; avaliação histopatológica de baço, fígado, rim, pulmão e coração; avaliação da toxicidade por ensaios bioquímicos de função renal e hepática; análise de focos de criptas aberrantes (FCA) em cólon; pesquisa de micronúcleos em medula óssea; bem como avaliar a biodisponibilidade dos compostos no plasma dos animais por meio de ensaios farmacocinéticos. Os ensaios *in vitro* demonstram que os compostos apresentaram atividade em promastigotas, com concentração efetiva 50% (CE₅₀) de 33,38 µg/mL para o HDAB e de 41,35 para o GE. Nas terapias de combinação em formas promastigotas, a somatória da média da concentração inibitória fracionária (CIF) foi de 1,67. Testes em amastigotas mostram CE₅₀ de 9,78µg/mL para o HDAB e 8,83µg/mL para o GE. A citotoxicidade em macrófagos de hamsters CC₅₀ de 70,29µg/mL para o HDAB e de 67,68µg/mL para o GE. Nas análises farmacocinéticas pode-se observar uma maior disponibilidade plasmática do GE quando combinado ao HDAB do que isoladamente; contudo não houve diferença na

biodisponibilidade do HDAB isolado ou em associação. Nos experimentos *in vivo*, sobre a carga parasitária em infecção com formas promastigotas, observou-se redução significativa entre o tratamento com Glucantime® e o grupo não tratado ($p < 0,01$), tanto em baço e fígado. Já em infecção com amastigotas houve redução da carga parasitária na combinação 75/25 comparado ao grupo não tratado ($p < 0,01$) em baço e fígado, sendo que para o Glucantime® ocorreu apenas no fígado ($p < 0,01$). No estudo histopatológico observou-se um processo inflamatório mais intenso nos grupos infectados com amastigotas em baço e fígado, sendo que o grupo 75/25 foi o que apresentou redução desse processo inflamatório no baço. Nos ensaios bioquímicos, apenas o grupo Glucantime® infectado com promastigotas apresentou aumento na produção de fosfatase alcalina. Não foi observada toxicidade dos compostos nos experimentos na produção de FCA e micronúcleos. Dessa forma, observamos que a combinação dos compostos (75/25) foi capaz de reduzir a carga parasitária em baço e fígado em animais infectados com formas amastigotas e diminuiu o processo inflamatório no baço. Os compostos não apresentaram nenhum tipo de toxicidade e foi possível realizar a farmacocinética para a quantificação dos compostos no plasma, utilizando o hamster como modelo animal.

Descritores: Leishmaniose visceral; Tratamento; Carga parasitária; Biologia molecular; Toxicidade; Farmacocinética.

ABSTRACT

Nunes JB. *Activity evaluation of phenolic compounds anti-Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in golden hamster* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Visceral leishmaniasis is a chronic systemic disease and when untreated can lead to death in a large number of cases. The available therapy is based on the use of pentavalent antimonials, which have been used for more than 50 years and presents cases of treatment failures in some countries. The search for new substances that meet safety standards is considered a priority for the treatment of the disease. Thus, we sought to evaluate the anti-*Leishmania* activity using the compounds 2-Hydroxy-4-O- (3,3-dimethyl) -allylbenzophenone (HDAB) and ethyl gallate (GE) isolated and in combination in the *in vitro* context, and *in vivo* in the golden hamster model, infected with promastigote and amastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. In addition to the pharmacokinetic evaluation of the compounds alone and in combination in uninfected animals. *In vitro* treatment were analyzed in promastigotes and amastigotes of this species, as well as cell cytotoxicity; in *in vivo* treatment by quantifying the parasitic load by qPCR in the spleen and liver; analysis of the immune response by cytokines expression by qPCR in the spleen and liver; histopathological evaluation of spleen, liver, kidney, lung and heart; assessment of toxicity by biochemical assays of renal and liver function; analysis of aberrant crypt foci (ACF) in colon; bone marrow micronucleus testing; as well assessment of bioavailability of the compounds in plasma of the animals by pharmacokinetic assays. *In vitro* tests demonstrate that the compounds showed activity against promastigotes, with an effective concentration of 50% (EC50) of 33.38 μ g / mL for HDAB and 41.35 μ g/mL for GE. In combination therapies in promastigote forms, the sum of the mean fractional inhibitory concentration (FIC) was 1.67. Tests in amastigotes showed EC50 9.78 μ g / mL for HDAB and 8.83 μ g / mL for GE. Cytotoxicity in macrophages of CC50 hamsters of 70.29 μ g / mL for HDAB and 67.68 μ g / mL for GE. In pharmacokinetic assays, was observed a higher plasma availability of EG when combined with HDAB than in isolation; however, there was no difference in the bioavailability of HDAB alone or in combination. In *in vivo* experiments, the parasitic load in infection with promastigote forms,

a significant reduction was observed between treatment with Glucantime[®] and the untreated group ($p < 0.01$), both in the spleen and liver. In infection with amastigotes forms, there was a reduction in parasitic load in 75/25 combination compared to the untreated group ($p < 0.01$) in spleen and liver, whereas for Glucantime[®] it occurred only in liver ($p < 0.01$). In histopathological assays, a more intense inflammatory process was observed in the groups infected with amastigotes in the spleen and liver, and the group 75/25 showed the reduction of this inflammatory process in the spleen. In biochemical tests, only the Glucantime[®] group infected with promastigotes showed an increase in the production of alkaline phosphatase. No toxicity of the compounds was observed in the experiments of ACF and micronuclei. Thus, we observed that the combination of the compounds (75/25) was able to reduce the parasitic load in the spleen and liver in animals infected with amastigote forms and decreased the inflammatory process in the spleen. The compounds did not present any type of toxicity and it was possible to perform pharmacokinetics for the quantification of compounds in plasma, using the hamster as an animal model.

Descriptors: Visceral leishmaniasis; Treatment; Parasitic load; Molecular biology; Toxicity; Pharmacokinetics.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem uma das mais significantes doenças tropicais negligenciadas, sendo que cerca de 350 milhões de pessoas que vivem em 88 países apresentam o risco de desenvolver alguma das formas da doença, seja a forma cutânea ou visceral (KEDZIERSKI, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima cerca de 300.000 casos de LV e com cerca de 20.000 mortes em humanos anualmente, sendo que 90% dos casos reportados e com risco de ocorrência estão concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopia, Índia, Nepal e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

É uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, anemia, hepato e esplenomegalia dentre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em grande número dos casos (MALTEZOU, 2008).

O tratamento e controle das leishmanioses é baseado em antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B, compostos que apresentam limitações como alta toxicidade, longo período de tratamento e contra-indicação em variados quadros (SUNDAR et al., 2007), pois entre seus efeitos incluem a dor no local das aplicações, problemas gastrointestinais, rigidez articular, e em alguns casos cardiotoxicidade, insuficiência renal e hepática (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). Na Índia, onde já existem relatos de falha aos tratamentos com os antimoniais, tem-se utilizado outros fármacos como a miltefosina e anfotericina B lipossomal, com melhora na resposta do tratamento às leishmanioses (MALTEZOU, 2008; MURRAY, 2001).

Nos últimos anos tem aumentado a necessidade de estratégias de monitoramento e controle da LV, sendo que uma das tentativas estudadas é a utilização da associação de substâncias para o tratamento, que possam reduzir a duração ou a dose total administrada, com diminuição dos efeitos tóxicos, menor custo e maior adesão dos pacientes (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; VAN GRIENSVEN; BOELAERT, 2011); aumento da atividade antimicrobiana através do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva; na tentativa de retardar o aparecimento de resistência aos fármacos e aumentar o espectro de atividade (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas do Gênero *Leishmania*. A infecção humana é causada por cerca de 21 das 30 espécies que infectam os mamíferos. Estes incluem o complexo *L. donovani* com duas espécies (*L. donovani*, *L. infantum* [também conhecido como *L. chagasi* no Novo Mundo]); o complexo *L. mexicana* com três espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*; e o subgênero *Viannia* com quatro espécies (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*). As diferentes espécies não se distinguem morfológicamente, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou por anticorpos monoclonais (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2020).

As principais formas clínicas incluem a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), leishmaniose visceral (LV), sendo considerada a forma mais grave da doença e leishmaniose dérmica pós Kalazar (LDPK), especialmente na Índia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

É considerada como doença tropical negligenciada, transmitida por vetores e em grande parte dos casos associado a condições de pobreza, desnutrição, deslocamento de populações, habitações precárias e sistema imunológico ineficiente. Concentra-se principalmente em países do Sudeste da Ásia, África Oriental e América Latina, sendo também endêmica em vários países mediterrânicos, tornando esta parasitose uma doença importante tanto para os habitantes locais como para os viajantes (PACE, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

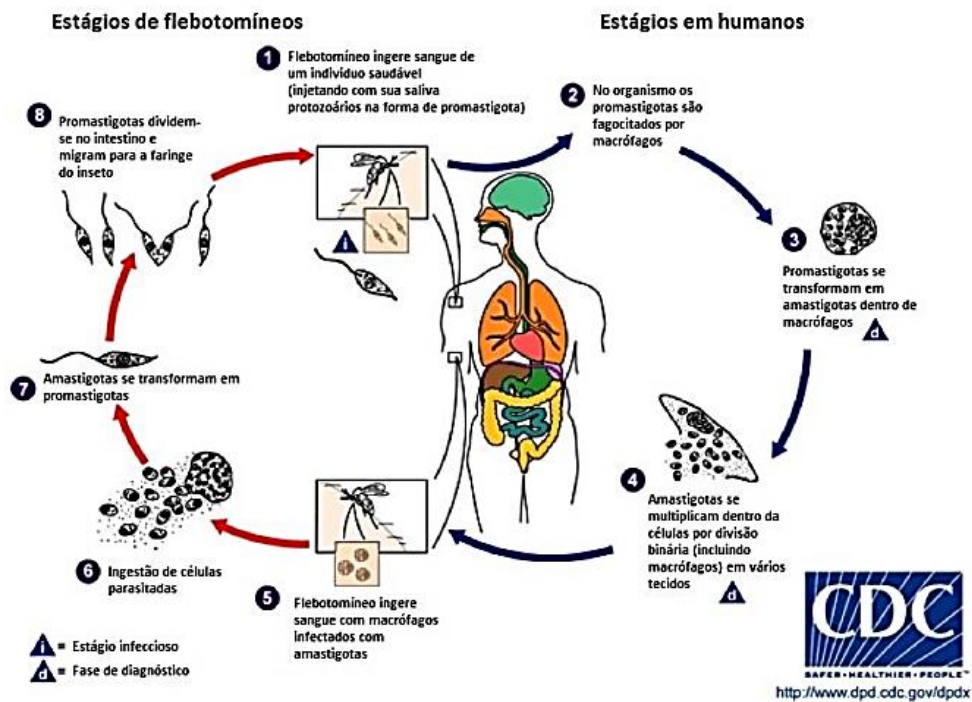
Desde 2013, o programa Global de Leishmaniose da OMS vem relatando o número de novos casos autóctones, para monitorar as taxas de incidência e o número de casos importados. Em 2015, 56 países endêmicos para LV (75%) e 59 países endêmicos para LC (68%) forneceram dados para a vigilância global. Noventa por cento dos casos de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com o maior número de casos de LC são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia,

Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos respondem por 87% da incidência mundial relatada de LC. Em 2015, o número de casos importados de LC foi alto na Turquia (815) e na República Islâmica do Irã (908). Já o número de casos de LV foi menor, com um total de 218 casos importados relatados em 2015. A maioria desses casos (76%) foi relatada na Etiópia e em Uganda. Em setembro de 2017, 38 países endêmicos para LV (50%) e 42 países endêmicos para LC (48%) relataram dados de 2016 ao programa da OMS (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020) .

A LV nas Américas, é considerada uma zoonose de grande impacto na saúde pública, caracterizada por elevada taxa de morbidade e letalidade. É causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*) e transmitida durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo considerados como principais vetores no Novo Mundo: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (DOS SANTOS et al., 1998; LAINSON; RANGEL, 2005). Em função da grande diversidade e interação entre as espécies hospedeiras, aos reservatórios e vetores, a doença tem se expandido para diversas regiões (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

2.2 Ciclo

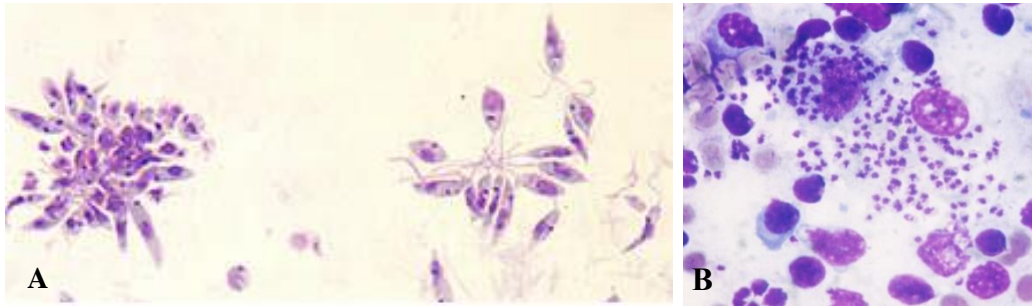
O ciclo evolutivo dos protozoários do gênero *Leishmania* consiste de uma fase em hospedeiros invertebrados, onde as formas promastigotas sofrem divisão binária no interior do tubo digestório dos flebotomíneos, e a fase em hospedeiros vertebrados, sejam eles humanos ou animais, com a presença de formas amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos, que se multiplicam da mesma forma, por divisão binária, ilustrado na Figura 1.



FONTE: Adaptado de CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020)

Figura 1- Ciclo das Leishmanioses.

A infecção ocorre quando as fêmeas dos flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo, ingerem macrófagos infectados com formas amastigotas, que no interior do tubo digestório do inseto se rompem e liberam as amastigotas, que logo em seguida se transformam em promastigotas que iniciam sua multiplicação. As formas promastigotas vão se direcionar a diferentes partes do intestino do inseto, dependendo da espécie do parasito (PETER, W; KILLICK-KENDRICK, 1988). As promastigotas permanecem no epitélio intestinal em processo de multiplicação até sofrerem um processo de metaciclogênese e então migrarem para a parte anterior do tubo digestório, até a glândula salivar. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre durante um novo repasto sanguíneo, quando a fêmea infectada regurgita as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro através de sua probóscide (aparelho bucal). Assim, essas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e dependendo da espécie do parasito, permanecem na pele ou migram para vísceras do hospedeiro vertebrado (GENARO, 2002). As formas promastigotas e amastigotas estão demonstradas na figura 2.



FONTE: DANTAS-TORRES, 2008; PREVENTION, 2020

Figura 2- Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania*.

2.3 Vetores

Têm-se como principais vetores da LV, os insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo que nas Américas as principais espécies são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (DOS SANTOS et al., 1998; LAINSON; RANGEL, 2005). É um inseto de 2 a 3 mm de comprimento bem adaptado ao ambiente peridomiciliar e distribuído por toda a América Latina (ROMERO; BOELAERT, 2010).

São pequenos insetos dípteros, muito pilosos, de cor-de-palha ou castanho-claros, que tem o hábito de pouso com as asas entreabertas e ligeiramente elevadas. Pertencem à família Psychodidae, que se caracteriza pelas asas em forma lanceolada revestidas com muitas cerdas longas; possuindo ainda nove ou mais veias atingindo a margem da asa e presença de nervuras transversais em sua metade basal, caracterizando a subfamília Phlebotominae. A atividade dos flebotomíneos é basicamente crepuscular ou noturna (REY, 2001).

Surtos de leishmaniose visceral na região nordeste do Brasil, com infecção canina e humana apresentou *Lu. longipalpis* como a espécie vetorial envolvida, sendo que essa população de insetos se encontra altamente adaptada às condições domiciliares e peridomiciliares e naturalmente infectada com *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005). Outros aspectos que favorecem a presença do vetor são os constantes desmatamentos, especialmente em áreas de criação de novas estradas e rodovias em que a aglomeração de pessoas, bem como presença de animais de estimação, muito próximos as

áreas de florestas, o que favorecem o repasto sanguíneo dos flebotomíneos (LAINSON; RANGEL, 2005).

Alguns autores levantam a hipótese de transmissão entre a população canina por meio de ectoparasitos, sugerindo a capacidade vetorial de pulgas e carrapatos (COLOMBO et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2012), outros também indicam a transmissão através de transfusões sanguíneas entre os cães, inclusive em bancos de sangue (OWENS et al., 2001; DE FREITAS et al., 2006; TABAR et al., 2008), via transplacentária (ROSYPAL et al., 2005; BOGGIATTO et al., 2011) e transmissão venérea (SILVA et al., 2009), porém ainda não está totalmente comprovada a importância epidemiológica desses outros meios de transmissão.

2.4 Resposta imune

O estabelecimento da infecção por *L. (L.) infantum chagasi* depende de vários fatores como a interação entre o parasito e o hospedeiro, da virulência do parasito, o grau de exposição ao vetor, mas especialmente da resposta imune do hospedeiro. Indivíduos com ineficiência em controlar a expansão e disseminação da doença desenvolvem a doença visceral na forma severa, que quando associadas a outras comorbidades tem um maior risco de irem a óbito (BUCHETON et al., 2002; COSTA et al., 2010; DA COSTA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016).

O controle da infecção por *Leishmania* é mediado por resposta imune celular levando a ativação de macrófagos e morte do parasito. A resposta humoral está presente no curso da infecção, porém os anticorpos não possuem nenhum efeito de proteção e geralmente estão associados à evolução do quadro da doença (PONTE-SUCRE; DÍAZ; PADRÓN-NIEVES, 2013).

A pele é a primeira barreira contra as formas promastigotas inoculados na derme pelos flebotomíneos. Esta resposta inicial é desencadeada através de receptores de reconhecimento padrão e receptores de complemento que vão recrutar células inflamatórias para o local, especialmente neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CDs) e células *natural killer* (NK) que darão início ao processo de fagocitose (LIU; UZONNA, 2012; KHADEM; UZONNA, 2014;). Estas células são as principais da resposta inata e

reconhecem os parasitos através de receptores *Toll-like* (TLRs), tais como receptores TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 e por auxílio do sistema complemento (CHATTERJEE et al., 2015; FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006; LAURENTI et al., 2004; MUKHERJEE et al., 2012; PAUN et al., 2011). Esses receptores induzem vias de sinalização intracelular que vão dar início as respostas inflamatórias inatas envolvidas na fagocitose e morte do parasito (MARAN et al., 2016).

Após a fagocitose e internalização das promastigotas por macrófagos, há formação do fagossoma e a fusão subsequente com os lisossomas, dando origem ao fagolisossomo, local onde os parasitos irão permanecer. Embora este seja um dos ambientes mais desafiadores para a maioria dos patógenos, a *Leishmania* está entre os poucos organismos que podem sobreviver e se multiplicar (LIU; UZONNA, 2012).

Tem sido demonstrado que os neutrófilos estão envolvidos no início de respostas inflamatórias contra *Leishmania*, induzindo uma liberação rápida de neutrófilos, formando armadilhas no meio extracelular, que promovem a contenção do parasito nos focos inflamatórios, facilitando a fagocitose dos mesmos. Este eficiente mecanismo leishmanicida desempenha um papel importante no controle precoce da carga parasitária (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). Outros estudos indicam que os neutrófilos desempenham um papel importante no controle do crescimento do parasito no baço, mas não no fígado. Foi observado que na ausência de neutrófilos há predominância de um ambiente com respostas Th2 não protetora, com um aumento dramático nos níveis séricos de IL-4 e IL-10 e de anticorpos não protetores (KHADEM; UZONNA, 2014).

Estudos sugerem que muitos neutrófilos são recrutados para o local da infecção, e estas células são fagócitos de vida curta, assim acredita-se que possam facilitar a evasão dos parasitos ao sistema imune, sendo considerados como "cavalos de Troia". Podendo ocorrer por dois mecanismos: primeiro, os parasitos no interior de neutrófilos não têm interação física direta com os receptores de superfície dos macrófagos e, conseqüentemente, não são ativados; e segundo, a captação de células apoptóticas silenciam o macrófago e nenhum mecanismo efetor é ativado contra o parasita intracelular. Assim, os neutrófilos são um abrigo temporário para preservar a *Leishmania* de um meio extracelular hostil antes de entrarem nas células hospedeiras finais, os macrófagos (LAUFS et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Estudos clínicos revelam que a LV humana tem uma imunologia complexa caracterizada por um misto de resposta do tipo *T-helper* 1 (Th1) e *T-helper* 2 (Th2), onde uma resposta Th1 suprimida, juntamente com uma Th2 elevada, indica uma falha na resposta imune, aumento da produção da IL-10, IL-4 e IL-13 com o quadro de susceptibilidade da doença (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Dessa forma o passo crucial na geração da imunidade anti-*Leishmania* é a manutenção da proporção de células T CD4+ e CD8+ e ativação do sistema imune adaptativo com produção de citocinas ativadoras de macrófagos IFN- γ e TNF- α com produção de espécies reativas de oxigênio (DAS; ALI, 2012; KHADEM; UZONNA, 2014; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Alguns autores indicam ainda a função da IL-17 como um outro mecanismo de proteção ou de resistência contra a LV, pois essa citocina está envolvida na regulação positiva de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e quimiocinas para atração de neutrófilos, com a função de proteção a infecções intracelulares (GHOSH et al., 2013; PITTA et al., 2009), porém este mecanismo não está completamente estabelecido. Assim, para que se obtenha resultados satisfatórios na terapia ou em desenvolvimento de vacinas contra a LV é sugerido uma regulação positiva da resposta Th1 (KUBAR; FRAGAKI, 2005).

2.5 Alterações histopatológicas na LV

A leishmaniose visceral é caracterizada por um acometimento do sistema fagocítico mononuclear (SFM), o que leva a hiperplasia, hipertrofia e parasitismo. Estão envolvidos componentes celulares, fibrilares, matriz extracelular e infiltrado de células mononucleares (LAURENTI, 2010). O baço apresenta hiperplasia e hipertrofia do SFM intensamente parasitado. Em cães foi descrito que o baço apresenta reação inflamatória crônica e difusa, com espessamento e inflamação da cápsula, hiperplasia e hipertrofia de polpa vermelha e polpa branca, vasos dilatados e congestos, depleção de zonas de linfócitos T e intenso parasitismo.

Alterações hepáticas encontradas são esteatose, degeneração hidrópica, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, formação de granulomas intralobulares, congestão de sinusoides, pequenos focos de infiltrado linfoplasmocitário intralobular, variando de acordo com a resposta imune à infecção (LAURENTI, 2010; SILVA et al., 2013). Na LV humana

a formação de granulomas no fígado está relacionado com o controle da infecção e manutenção da doença em um estado subclínico (MURRAY, 2008).

2.6 Tratamento disponível

Os antimoniais pentavalentes estão disponíveis para o tratamento das leishmanioses há mais de 70 anos, porém já foi demonstrado que apresentou falhas no tratamento em Bihar na Índia, mas continua sendo utilizado em todo o resto do mundo principalmente nas formulações estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de meglumine (Glucantime[®]) (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; CROFT; OLLIARO, 2011).

A Anfotericina B é considerada o medicamento de segunda escolha para o tratamento dos casos de leishmanioses, especialmente nos casos de leishmaniose mucocutânea não responsiva a outros tratamentos. Suas formulações lipossomais (amBisome[®], Amphotec[®] e Abelcet[®]) tem sido indicado em casos específicos como em pacientes imunossuprimidos, portadores de vírus da imunodeficiência humana (HIV) e crianças, com efeitos tóxicos muito menores. No entanto, as dificuldades estão relacionadas ao seu elevado custo e estabilidade em temperaturas mais elevadas e a demanda de um grande número de ampolas para o tratamento (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; CROFT; OLLIARO, 2011)

A pentamidina tem sido utilizada desde 1952 como segunda linha de tratamento nos casos resistentes aos antimoniais, porém a limitação de uso está relacionada à sua alta toxicidade induzindo casos de hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia e dor no local da aplicação (CROFT; YARDLEY, 2002).

A miltefosina foi o primeiro fármaco de uso oral registrado para o tratamento da LV, mas sua eficácia ainda não foi comprovada para espécies de LV no Novo Mundo (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Sua atividade foi inicialmente investigada em inibição de crescimento tumoral, sendo uma de suas formulações (Miltex[®]) aprovada para uso em certos casos de cânceres na Europa (CROFT; YARDLEY, 2002). Seus efeitos colaterais ocorrem principalmente no trato gastrointestinal e há contraindicação em gestantes pelos seus possíveis efeitos teratogênicos (SINDERMANN; ENGEL, 2006).

2.7 Derivados de produtos naturais

Compostos fenólicos, como os derivados de benzofenonas, tem apresentado atividade antimicrobiana contra diversos agentes patogênicos, dentre eles pode-se citar os relatos de atividade contra bactérias *Escherichia coli* (VOOTURI et al., 2009); utilização como antifúngico em biofilmes de *Candida albicans* (JACKSON et al., 2015) e também apresenta resultados quando utilizados *in vitro* contra formas amastigotas de *Leishmania donovani* (LENTA et al., 2007) assim como em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, (PEREIRA et al., 2010^a; DE ALMEIDA et al., 2015;), indicando baixa toxicidade. Alguns autores sugerem a atividade anti-*Leishmania* de compostos de sais de Bisfosfonio derivados de benzofenonas à mecanismos de comprometimento da funcionalidade de mitocôndrias do parasito, através da inibição do complexo respiratório II, levando ao comprometimento da produção de ATP e consequente danos ao metabolismo energético (LUQUE-ORTEGA et al., 2010).

A busca de substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade, tem intensificado os estudos para a descoberta de novos compostos com potencial terapêutico leishmanicida. Neste contexto, o laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) vem obtendo uma quantidade de substâncias, advindas de produtos naturais, através de rotas de síntese e semi-síntese com algumas propriedades biológicas.

O grupo de pesquisa mostrou que algumas benzofenonas naturais, isoladas dos frutos de *Garcinia brasiliensis* possuem atividade leishmanicida contra as formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*. Sendo possível correlacionar a atividade leishmanicida com o caráter lipofílico destas moléculas, devido a presença de grupos prenila, além da baixa toxicidade quando avaliadas em macrófagos (PEREIRA et al., 2010).

Com base nestes resultados, o grupo decidiu explorar o esqueleto benzofenônico presente naqueles produtos naturais, para o planejamento de análogos sintéticos, estruturalmente simplificados, na expectativa que pudessem exibir atividades semelhantes às observadas, mantendo a baixa toxicidade e com menores dificuldades para a síntese (DE ALMEIDA et al., 2015).

Inicialmente foi realizada a síntese de derivados de 2,4-diidroxibenzofenona, 4-hidroxibenzofenona e 4,4'-diidroxibenzofenona) e sua avaliação da atividade antioxidante

pelo mecanismo de captação de radicais livres DPPH, inibitória de xantina oxidase e antimicrobiana. Esses derivados sintéticos foram testados *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*, apresentando resultados satisfatório e com baixa toxicidade (DE ALMEIDA et al., 2015). O grupo também realizou alguns testes *in vivo* com alguns desses derivados e encontraram resposta promissora para um desses compostos, que foi o selecionado para a realização deste estudo (HDAB) (COLOMBO et al., 2017).

No mesmo sentido de busca por novas substâncias promissoras, o grupo de pesquisa (LFQM) investigou o potencial de atividade de isolados a partir de plantas da espécie *Euphorbia cotinifolia* (GRAZIELLE et al., 2015). Existem vários compostos bioativos relatados nas espécies da *Euphorbia*, como flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos, cumarinas, esteroides, saponinas e compostos fenólicos (MWINE; VAN DAMME, 2011; GRAZIELLE et al., 2015;), sendo que já foi possível identificar atividade contra promastigotas de *Leishmania infantum* e contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* de alguns derivados de *Euphorbia* (BAILEN et al., 2016).

Um dos compostos isolados a partir dos extratos de *Euphorbia cotinifolia* foi o galato de etila, que foi selecionado para a utilização nesse estudo. O galato de etila é um composto fenólico encontrado em um grande número de espécies de plantas e sua utilização tem sido descrita em associação aos antibióticos tetraciclina, mupirocina e ácido fusídico em testes *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, demonstrando efeito de sinergismo com esses antibióticos em determinadas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Apresenta o efeito de prolongar e potencializar o efeito bactericida de antibióticos, com um pico de combinação com duração de 8 até 24 horas (SOE et al., 2010). Outros estudos utilizando produtos de galatos e catequinas sugerem uma modulação da resistência à betalactamase quando combinados com oxacilina em cepas de *S. aureus*. Seu mecanismo de modulação parece estar relacionado à atuação em membrana citoplasmática, com alterações em hidroxilação de lipídeos, ou podendo ainda estar relacionado à ligação aos peptidoglicanos (STAPLETON et al., 2004).

Calderon et al., (2006) analisaram variados extratos de plantas na região do Panamá, e encontrou atividade antiparasitária dos isolados galato de etila e galato de metila contra *Leishmania mexicana* e clones de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina.

Estudo realizado por Mohan et al., (2014) indica que o galato de etila é capaz de reduzir o stress oxidativo *in vitro*, com a preservação do DNA nos grupos tratados. Avaliou

também a toxicidade *in vivo* do galato de etila, administrado por via oral em ratos, em que foi possível verificar que mesmo na maior dose (20mg/Kg) não houve mortalidade em nenhum dos grupos experimentais, esses apresentaram maior ganho de peso, e nas análises bioquímicas foi possível verificar pouca ou nenhuma alteração em níveis de glicemia, enzimas de perfil hepático (AST, ALT, FA) e perfil renal (Creatinina e bilirrubina total) comparado ao grupo controle.

2.8 Modelo *in vivo*

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) se tornou um modelo de estudos em *Leishmania* a partir dos estudos sistematizados de Stauber (1958) em comparação a outras espécies como ratos e coelhos, que são resistentes à infecção. Estudos realizados por Melby et al. (2001) mostraram aumento da carga parasitária em baço, fígado e medula óssea de hamsters infectados com promastigotas de *L. donovani*. Apesar de uma alta expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) no fígado, baço e medula óssea, a replicação de parasitos levam a uma doença progressiva, além de uma produção de TGF- β e IL-10, que possivelmente impedem a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, consequentemente a evolução da doença neste modelo experimental (MELBY et al., 2001).

Em estudos conduzidos por Requena et al., (2000) utilizando hamsters com diferentes concentrações de inóculos de *L. infantum* (10^3 , 10^4 e 10^5) verificou-se que quanto maior o inóculo, mais precoce são os sinais clínicos e resposta imunológica, sendo que alguns dos animais se mantiveram assintomáticos, enquanto outros, inoculados com a mesma concentração de parasitos, desenvolveram infecções com sinais imunológicos e clínicos pronunciados.

Dea Ayuela (2007) infectaram hamsters utilizando alta (10^7) e baixa (10^5) concentração de formas promastigotas de *L. infantum* por via intracardíaca. Os resultados demonstraram o estabelecimento da infecção independente da dose administrada, porém com evolução mais rápida da doença nos animais inoculados com dose mais elevada (10^7), apresentando sinais clínicos evidentes e elevada carga parasitária esplênica três meses após a infecção. Isso demonstra que altas concentrações de formas promastigotas metacíclicas por

via intracardíaca, induzem infecção sintomática, permitindo o estabelecimento de grupos uniformes para os estudos.

O hamster dourado é considerado como um modelo experimental adequado para o estudo das características patológicas da LV, por apresentar manifestações clínicas sintomáticas e oligossintomáticas com evolução para a doença fatal semelhante ao que ocorre em humanos, além das características histológicas como hipoplasia de polpa branca no baço, granulomas hepáticos, deposição de substância amiloide no baço e no fígado (WILSON et al., 1987; RIÇA-CAPELA et al., 2003; NIETO et al., 2011) e glomerulonefrite relacionada à deposição de imunocomplexos. No entanto, existem indicações que não é um modelo adequado para a avaliação de estratégias de imunização devido à alta sensibilidade inata do animal em mecanismos de supressão da resposta imune linfoproliferativa (NIETO et al., 2011).

Riça-Capela et al., (2003) em um estudo de inoculação por via intraperitoneal com formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum* em hamsters, puderam observar que a infecção com amastigotas leva a um aumento mais rápido da carga parasitária tanto no baço quanto no fígado, sendo o baço o primeiro órgão a se tornar parasitado, seguido de fígado e medula óssea. Foi observada a presença de sinais clínicos como ascite, anemia e caquexia independente da forma de infecção utilizada, contudo sendo o tempo menor de aparecimento dos sinais na infecção por amastigotas.

Desta forma, considerando a susceptibilidade do hamster (*Mesocricetus auratus*) a diferentes espécies de *Leishmania* e por desenvolver sinais clínicos e alterações histopatológicas semelhantes aos observados na LV canina e humana, esse modelo foi escolhido para a avaliação da resposta terapêutica à infecção por *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

3 JUSTIFICATIVA

A LV se tornou um grave problema de saúde pública, pois o tratamento de escolha preconizado, baseado em antimoniais pentavalentes utilizados há mais de 50 anos, apresenta vários efeitos tóxicos, e diferentes níveis de eficácia em diversas regiões do mundo. Um agravamento é não existirem vacinas com eficácia, que possam ser utilizadas nos programas de controle da LV. Desse modo, a busca por novas estratégias terapêuticas a partir de compostos que forneçam atividade leishmanicida e com menores efeitos danosos aos pacientes torna-se de grande relevância em doenças negligenciadas como a LV.

O modelo experimental hamster dourado geralmente exibe diversos sinais clínicos típicos de LV durante a infecção experimental, à semelhança da doença humana e canina, tais como pancitopenia marcada por leucopenia e anemia, caquexia, hipergamaglobulinemia e ausência de resposta de células T específicas após a infecção experimental (MATHIAS; COSTA; GOTO, 2001). Essa ausência de resposta tem sido atribuída à incapacidade de células apresentadoras de antígeno (APCs) em estimular células T específicas (FRUTH; SOLIOZ; LOUIS, 1993), isso tem sido considerado como elemento chave na progressão da LV nesse modelo, que poderia reproduzir a forma grave da doença humana bem como a LVC (NIETO et al., 1992). Mesmo com uma forte produção de citocinas no fígado, baço e medula óssea destes animais, há replicação descontrolada do parasito, conduzindo a um padrão de doença progressiva neste modelo (MELBY et al., 2001), o que possibilita a utilização para avaliação de resposta ao tratamento de LV e avaliação do perfil de resposta, bem como alterações estruturais em órgãos como fígado e baço.

A combinação de terapias para o tratamento da LV tem se tornado uma alternativa para aumentar a atividade anti-*Leishmania*, diminuir a chance de resistência especialmente quando a combinação se trata de substâncias com alvos de atuação diferentes. Com isso, tenta-se reduzir o tempo e custos com os tratamentos. Dessa forma a tendência é criar um arsenal de substâncias alvo com maior espectro de ação e que não apresentam resistência cruzada (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006).

Assim, a busca por novos compostos que apresentem menores efeitos colaterais, bem como atividade leishmanicida *in vivo* promissora, em um modelo animal que seja capaz de mimetizar a infecção em humanos e/ou em cães, se mostra como uma alternativa para o

desenvolvimento de protótipos a fármacos para o tratamento e controle da leishmaniose, devido aos diversos efeitos danosos causados pela terapia atual disponível para LV.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos 2-Hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona (HDAB) e galato de etila (GE); além da avaliação em associação entre os dois compostos nos contextos *in vitro* em *Leishmania (L.) infantum chagasi* e *in vivo* empregando hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados com esta espécie; em comparação com a droga padrão Glucantime®.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em diferentes concentrações dos compostos HDAB e GE isolados e em associação.
- Avaliar a citotoxicidade dos diferentes compostos em macrófagos; além do índice de infecção de macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*.
- Realizar os ensaios farmacocinéticos de estabilidade química e plasmática dos compostos, bem como suas biodisponibilidades absolutas e perfis cinéticos nos animais saudáveis.
- Avaliar a taxa de sobrevivência dos animais nos diferentes grupos experimentais infectados com promastigotas ou amastigotas;
- Determinar a carga parasitária no fígado e baço pela qPCR (Linj31);
- Determinar a expressão de mRNA das citocinas IL-10; IL-4, TGF- β , IFN- γ , IL-17 e TNF α no baço e fígado dos animais infectados.
- Determinar as alterações histopatológicas no fígado, baço, rim, pulmão e coração dos grupos infectados e não infectados;
- Realizar ensaios de toxicidade pelos testes bioquímicos sanguíneos (ALT, AST, Ureia, Creatinina, GGT e FA) em todos os grupos experimentais;

- Realizar ensaios de toxicidade in vivo pela presença de focos de criptas aberrantes e pesquisa de micronúcleos em medula óssea nos animais não infectados tratados com os compostos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos compostos

5.1.1 Obtenção do HDAB

O composto 2-Hidroxi-4-O-(3,3-dimetil)-alilbenzofenona (HDAB) foi produzido de acordo com Maciel-Rezende et al., (2013), por reações de alquilação sobre as hidroxilas fenólicas dos substratos da 2,4-diidroxibenzofenona comercial (Sigma Aldrich®). Inicialmente foi denominado LFQM-117, posteriormente identificado como HDAB, cedido gentilmente pelo grupo de pesquisa Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas –MG para a realização dos ensaios.

Sua fórmula química:

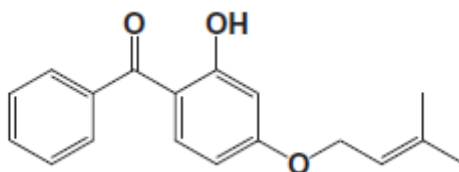


Figura 3 - Fórmula química do HDAB

5.1.2.Obtenção do galato de etila

O composto galato de etila foi produzido a partir de ácido gálico, etanol e ácido sulfúrico (ACHALKUMAR et al., 2013; GRAZIELLE et al., 2015). Foi gentilmente cedido pelo laboratório de Química de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas –MG para a realização dos ensaios.

Sua fórmula química:

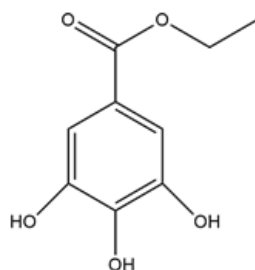


Figura 4 - Fórmula química do GE

5.2 Experimentos *in vitro*

Para a realização dos experimentos *in vitro*, foi utilizada a espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46), caracterizadas no Instituto Evandro Chagas, Pará – Brasil. O isolamento e expansão dos parasitos foi realizado em meio Schneider, suplementado com 10% SFB, 50000UI/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina.

5.2.1 Atividade antipromastigotas

Promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em final de fase logarítmica de crescimento foram adicionadas a placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 10^7 células/mL, juntamente com diferentes concentrações dos compostos HDAB e GE em duplicata (faixa de concentração: 100µg/mL a 0,781µg/mL – diluição seriada de 1:2) que foram diluídos em DMSO (0,6% v/v), e como controle, foi utilizado o fármaco padrão Anfotericina B, na faixa de concentração: 10µg/mL a 0,156µg/mL. As culturas foram mantidas em estufas BOD a 25°C em diferentes tempos de incubação: 24, 48 e 72h. Após a incubação as placas foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C por três vezes para a remoção dos compostos dos poços. Em seguida foram submetidos a análise de viabilidade das promastigotas, utilizando-se 50µL/poço de uma solução estéril de MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a 4mg/mL em solução

salina tamponada com fosfato (PBS), incubados por 4 horas, seguido da adição de 50 μL de uma solução de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. Após o período de 18h de incubação as placas foram analisadas em um leitor de microplacas GloMax®-Multi+ Detection System Accessories, Promega, em comprimento de onda 560nm. De acordo com os resultados, foi criada uma tabela a partir dos gráficos contendo curvas do tipo dose-resposta com o uso do programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), e a CE_{50} foi estimada. Os experimentos foram repetidos em três momentos diferentes.

5.2.2 Determinação das interações entre os compostos *in vitro*

Após a avaliação individual para cada um dos compostos, foram montados experimentos com a combinação dessas substâncias. As possíveis interações entre os compostos HDAB e GE foram avaliados *in vitro* por meio de isoblograma modificado (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Os valores de CE_{50} determinados anteriormente nos experimentos isolados, foram utilizados para a escolha das doses máximas das combinações, sendo que o CE_{50} se manteve no terceiro ponto da diluição seriada, seguindo a proporção de combinações 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5, que foram diluídos serialmente (1:2) até o sétimo poço da duplicata.

Promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de $1 \times 10^7/\text{mL}$ em um volume final de $200\mu\text{L}$ contendo a diluição de cada composto pré-determinado. A concentração inicial máxima foi de $154\mu\text{g}/\text{mL}$ de HDAB e $161\mu\text{g}/\text{mL}$ de GE, estabelecida previamente pelos resultados dos compostos isoladamente. Os compostos foram mantidos em contato com as culturas durante 48h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT, conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em três momentos distintos.

5.2.3 Determinação das Concentrações Inibitórias Fracionárias e classificação das associações

Foram calculadas as concentrações inibitórias fracionárias (CIFs), o somatório das CIFs (Σ CIFs) e a média do somatório das CIFs ($\bar{\Sigma}$ CIFs):

$$\text{CIF} = \frac{\text{CE}_{50} \text{ substância em associação}}{\text{CE}_{50} \text{ substância individual}}$$

$$\Sigma \text{CIFs} = \text{CIF substância A} + \text{CIF substância B}$$

$$\bar{\Sigma} \text{CIFs} = \frac{\text{soma das } \Sigma \text{CIFs}}{4}$$

Foram realizados isobogramas *in vitro* em formas promastigotas para avaliar a interação entre os compostos. O isobograma é um tipo de representação gráfica onde se utilizam os valores das CE_{50} ou das CIF de duas substâncias utilizadas juntas. O gráfico fornece uma exibição visual das doses aditivas teóricas (e doses experimentais) utilizados para exibir os resultados, mas não são utilizados na análise estatística. Em vez disso, a análise é baseada na Σ CIF (TALLARIDA; KIMMEL; HOLTZMAN, 1997).

O método do isobograma de proporções fixas possui vantagens em relação ao método *checkerboard*, pois utiliza diluições seriadas de proporções fixas de ambos os fármacos, assim, as concentrações são variadas ao mesmo tempo ao longo de um intervalo de concentração predeterminado. Dessa forma, as curvas de dose-resposta dependem das razões de concentração do fármaco, cada uma calculada de 0 a 100% de inibição do parasito, permitindo um ajuste mais preciso da curva de regressão e CE_{50} (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004).

Os valores de CIF desse estudo foram classificados de acordo com Odds, que consiste na interpretação de $\text{CIF} < 0,5$: sinergismo; $\text{CIF} > 4$: antagonismo; $\text{CIF} > 0,5$ e < 4 indiferente/aditivo.

5.2.4 Infecção *in vitro*

Macrófagos peritoneais de hamster foram colhidos e submetidos a contagem em câmara de Neubauer com azul de *Trypan*. Em seguida, as células foram ajustadas a uma concentração de 10^6 macrófagos/mL em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino, L-glutamina, ampicilina e foram adicionadas em lamínulas redondas estéreis 13mm em placas de 24 poços. Após cerca de duas horas, as placas foram lavadas com solução de PBS estéril para remover as células que não aderiram as lamínulas. Para a infecção experimental *in vitro*, formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* em fase estacionária de crescimento foram adicionadas a cada poço teste na proporção de 10 promastigotas para 1 macrófago, e foram mantidos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Após esse período as placas foram novamente lavadas com PBS para retirar as formas que não infectaram os macrófagos. Em seguida foram adicionados os compostos nas concentrações de 40, 20, 5 e 1,25 µg/mL em duplicata, assim como os controles anfotericina B nas concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg/mL e mantidos em incubação por 48h. Ao término do tratamento as lamínulas foram lavadas, secas, fixadas com metanol, coradas com Giemsa e montadas em lâminas. As células foram observadas a um aumento de 1000x e contados 200 macrófagos/lamínula e o índice de infecção foi calculado de acordo com a fórmula:

Índice de infecção: % de macrófagos infectados x n° parasitos/macrófago.

A partir disso foram calculadas as CE50 para cada combinação, conforme descrito anteriormente em promastigotas.

5.2.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em macrófagos peritoneais de hamster, que foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços em meio RPMI, juntamente com os compostos a partir da concentração de 100µg/mL em diluição seriada (1:2) de forma isolada,

e em associação a partir das concentrações obtidas nos ensaios com promastigotas, por um período de 48 horas de incubação. Em seguida as placas foram centrifugadas a 1000rpm durante 10 minutos a 4°C por três vezes para a remoção dos compostos dos poços. Para avaliação da toxicidade, foi realizado o ensaio com o reagente Presto Blue® Cell Viability (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante, e após cerca de duas horas de incubação procedeu-se a leitura em leitor de microplacas, GloMax®-Multi+ Detection System Accessories, Promega, em fluorescência, com excitação e emissão a 580 e 640nm respectivamente.

5.4 Ensaios farmacocinéticos

5.4.1 Aspectos Gerais

O estudo é do tipo experimental, analítico e quantitativo e foi realizado no Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF-UNIFAL-MG e no biotério de experimentação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa, a metodologia teve a colaboração da professora Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques e a colaboração dos alunos Taila Kawano e Rodrigo Plácido.

5.4.2 Reagentes

Para a realização dos procedimentos do estudo, foram utilizados os seguintes reagentes: Acetonitrila (solvente orgânico de grau HPLC) adquirido a partir de LiChrosolv® (Darmstadt, Alemanha), bem como o metanol. O ácido fórmico obtido da Vetec®. A água ultrapura foi purificada com o sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Foram preparadas soluções de reserva de padrão interno, HDAB e GE em metanol. As diluições necessárias foram feitas a partir de soluções de estoque para construir uma curva padrão. Todos os padrões foram armazenados a -20°C.

5.4.3 Equipamentos

Para a realização dos procedimentos foram utilizados: Balança MicroAnalítica AUW 220D (Shimadzu®), agitador de tubos vórtex Gomixer (MX-S ®), concentrador a vácuo CentriVap (Kansas City, EUA), Centrífuga LS-3 Plus (CELM®), microcentrífuga Centrifuge 5424 (Eppendorf®) e UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030.

5.4.4 Condições cromatográficas

A metodologia analítica para determinação dos compostos HDAB e GE em plasma de hamster foi validada em UPLC-MS/MS Shimadzu LCMS-8030. As padronizações foram efetuadas separadamente devido as diferentes características de cada composto.

Para o HDAB, a fase móvel utilizada foi acetonitrila: formiato de amônio 2mM pH 2,4 (90:10 v:v), com fluxo de 0,4mL/min. O tempo de corrida foi otimizado em 6 minutos, com o início da eluição do pico em torno de 4 minutos. A coluna cromatográfica utilizada foi C₁₈ da Marca NST (150mm x 4,6mm x 5µm). Os padrões de quebra do HDAB foram m/z 282,2>215,05, 136,95 e 105,05. O volume de injeção foi de 50µL.

Para o GE, a fase móvel utilizada foi acetonitrila: formiato de amônio 10mM pH 4,0 (50:50 v:v), com fluxo de 0,4mL/min. O tempo de corrida foi otimizado em 15 minutos, com o início da eluição do pico em torno de 5 minutos. Os padrões de quebra do GE foi m/z 197>124, 125 e 169. O volume de injeção foi de 50µL.

5.4.5 Preparo da amostra

O método de preparo do plasma para injeção no cromatógrafo foi por meio da precipitação de proteínas por acetonitrila (*clean-up*).

Para o HDAB, em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 50µL de plasma, 10µL de NaOH 2,5% e 600µL de acetonitrila. Então agitou-se em vórtex por 1 minuto, e posteriormente centrifugou-se por 10min a 14.000 rpm. Após a centrifugação, retirou-se

500µL do sobrenadante para um novo microtubo, e este foi submetido a secagem em uma concentradora de amostra até a secagem completa. Após a secagem, o resíduo foi ressuspensionado com 50µL da fase móvel e transferido para os *vials* contendo *inserts*, seguido da injeção de 25µL no cromatógrafo.

Para o GE, em um microtubo foram adicionados 50µL de plasma, 10µL de ácido fórmico 10% e 600µL de acetonitrila. Então agitou-se em vórtex por 1 minuto, e posteriormente centrifugou-se por 10min a 14.000 rpm. Após a centrifugação, retirou-se 500µL do sobrenadante, transferiu-se para um novo microtubo, e este foi submetido a secagem em uma concentradora de amostra até a secagem completa. Após a secagem, o resíduo foi ressuspensionado com 100µL da fase móvel e transferido para os *vials* contendo *inserts*, seguido da injeção de 50µL no cromatógrafo.

O método bioanalítico de quantificação do analito foi desenvolvido e validado segundo a Resolução RDC nº 27 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012).

Avaliou-se a linearidade, exatidão e precisões inter e intradia.

5.4.6 Linearidade

A legislação estabelece que o método deve possuir o valor de R maior ou igual a 0,98.

A equação gerada para o HDAB foi: $y = 787,89x - 211705$, e o $R^2 = 0,9834$. A curva abrangeu as concentrações de 250 à 7500 ng/mL.

A equação gerada para o GE foi: $y = 2791,8x + 20100$, e o $R^2 = 0,9855$. A curva abrangeu as concentrações de 10 à 7500 ng/mL.

As concentrações das amostras de controle de qualidade em plasma foram definidas da seguinte forma (BRASIL, 2012):

- a) LIQ – Limite Inferior de Quantificação (LIQ – HDAB : 250 ng/mL e GE : 10,0 ng/mL);
- b) CQB – Controle de qualidade baixo (CQB – HDAB : 500 ng/mL e GE : 250 ng/mL);
- c) CQM – Controle de qualidade médio (CQA – HDAB : 1250ng/mL e GE : 1250 ng/mL);
- d) CQA – Controle de qualidade alto (CQ – HDAB : 5000,0 ng/mL e GE : 5000,0 ng/mL);

O limite inferior de quantificação foi definido considerando-se a sensibilidade, precisão, a exatidão e a ausência de efeito da matriz biológica. A resposta do pico

cromatográfico do analito no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de no máximo 20% e exatidão entre 80 a 120% em relação a concentração nominal do padrão, através da análise de seis replicatas de padrões (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2012).

5.4.7 Curva de Calibração

Para determinação da curva de calibração foram analisadas amostras extraídas da matriz biológica, de seis diferentes concentrações do padrão do analito, preparadas em quadruplicatas. Para preparo de cada amostra, adicionou-se 25,0µL de padrão e 50µL de plasma branco (plasma de animal saudável sem nenhum tipo de tratamento) em seis concentrações distintas, essas concentrações foram definidas levando-se em consideração a sensibilidade da técnica bioanalítica e a faixa prevista das concentrações das amostras a serem determinadas (10; 100; 1000; 2500; 5000; 7500ng/mL plasma). Processou-se a amostra através da precipitação de proteínas com acetonitrila e o sobrenadante foi levado à secagem em concentrador a vácuo e aquecimento (37°C), sendo então ressuspensas em 100µL de fase móvel para posterior injeção no UPLC-MS/MS. A linearidade do método foi testada a partir do mesmo procedimento descrito acima, de 10 a 7.500 ng/mL de plasma para o GE e 250 a 5.000 ng/mL para o HDAB.

5.4.8 Precisão e Exatidão Intra e Interdia

Segundo a ANVISA a precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea em idênticas condições de ensaio, enquanto que a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2012).

A precisão intracorrída foi avaliada em um mesmo dia e a intercorrídas em três dias distintos. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). O DPR é calculado segundo a equação:

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

A exatidão intracorrída foi avaliada em um mesmo dia e a intercorrídas em três dias diferentes. A exatidão foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativa (EPR) conforme equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração eórica})}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Para avaliação dos parâmetros precisão e exatidão, foram analisadas amostras fortificadas com padrões de HDAB e GE (8 amostras) em concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA em plasma após passarem pelo processo de preparo de amostras, não se admitindo valores superiores a 15% exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. Os valores estão demonstrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Precisão e exatidão intracorrídas e intercorrídas referente ao método analítico para quantificação de HDAB em plasma de hamster analisado em UPLC-MS/MS

Concentração	Precisão		Exatidão	
	Intradia	Interdia	Intradia	Interdia
LIQ (250ng/mL)	4,18%	11,05%	18,34%	8,24%
CQB (500ng/mL)	14,22%	12,32%	5,60%	7,31%
CQM (1250ng/mL)	7,88%	8,94%	3,92%	1,67%
CQA (5000ng/mL)	7,66%	6,20%	0,41%	0,04%

NOTA: LIQ: Limite Inferior de Quantificação. CQB – Controle de qualidade baixo. CQM – Controle de qualidade médio. CQA – Controle de qualidade alto.

Tabela 2 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de GE em plasma de hamster analisado em UPLC-MS/MS

Concentração	Precisão		Exatidão	
	Intradia	Interdia	Intradia	Interdia
LIQ (10ng/mL)	14,87%	13,04%	10,02%	8,72%
CQB (250ng/mL)	7,64%	8,56%	14,32%	13,13%
CQM (1250ng/mL)	6,20%	10,82%	4,34%	2,81%
CQA (5000ng/mL)	6,00%	14,36%	1,71%	5,19%

NOTA: LIQ: Limite Inferior de Quantificação. CQB – Controle de qualidade baixo. CQM – Controle de qualidade médio. CQA – Controle de qualidade alto

5.4.9 Experimentos com animais

Os animais foram anestesiados utilizando uma mistura de ketamina e xilazina (200mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente), após atingirem plano anestésico foram submetidos à canulação da veia jugular externa direita, que foi fixada na região subcutânea da nuca e com acesso externo ao dorso do animal, para que fosse possível a colheita de amostras. Os animais receberam nesse momento uma solução glicosada para facilitar sua recuperação no pós-operatório e evitar possíveis quadros de hipoglicemia e/ou hipovolemia.

Após cerca de 24 horas do procedimento de canulação e após a recuperação dos animais, esses foram mantidos em jejum sólido de aproximadamente 6 horas e então receberam por via oral a dose correspondente a 15mg/Kg, de cada composto, de acordo com o grupo alocado, ou seja, um grupo recebeu 15mg/Kg de HDAB (n=6); um grupo recebeu 15mg/Kg de GE (n=6); e um grupo recebeu a mistura de 15mg/Kg de HDAB e 15mg/Kg de GE (n=6). Dessa forma foram utilizados 6 animais para cada grupo (total n=18) para que as análises de cada perfil fossem realizadas em sextuplicata, garantindo a fidedignidade dos resultados obtidos. Em seguida ao tratamento foram colhidas amostras de sangue nos instantes 5, 10, 15 e 30 minutos; 1, 1,5, 2, 3, 4 e 6 horas pós-gavagem, nas cânulas fixadas previamente e transferidas a um microtubo contendo solução de heparina. Os animais recebiam a cada momento de colheita uma reposição hídrica de solução de cloreto de sódio a 0,9%. O material obtido foi centrifugado a 2000rpm durante 10 minutos para retirada do plasma e congelado a -80°C para as análises posteriores de espectrometria de massas.

As amostras foram analisadas em UPLC-MS/MS para avaliar a estabilidade química e plasmática; biodisponibilidade absoluta e perfil cinético dos compostos. O experimento foi realizado em animais saudáveis para que se estabeleça o perfil em condições de normalidade.

5.4.10 Análises farmacocinéticas

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o software WinNonlin® versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Califórnia, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática versus tempo, após a administração oral dos fármacos foram analisados empregando-se o modelo monocompartimental, que foi o que melhor se adequou aos dados obtidos. Por meio do software foram obtidos os valores de $AUC^{0-\infty}$, meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), concentração plasmática máxima (C_{max}), o tempo para atingir C_{max} (t_{max}) e o clearance total aparente (CIT/f). O software WinNonlin® gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos (GABRIELSSON, J; WEINER, 2000). A estimativa final inclui o *clearance* total aparente (CIT/f).

5.5 Experimentos *in vivo*

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos, com peso entre 80 a 100g, mantidos em caixas de plástico, com material absorvente autoclavado (maravalha), recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

Quando os animais completaram oito semanas de vida, os pertencentes aos grupos infectados com promastigotas receberam por via intraperitoneal (IP) a concentração de 2×10^7 promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) mantidas em culturas. Os grupos infectados com amastigotas, receberam a concentração de 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46) obtidas por

centrifugação diferencial de baço de animal previamente infectado, sendo que o número de parasitos foi determinado pelo método de Stauber (1958).

Após 60 dias de infecção, os animais receberam tratamento durante 15 dias consecutivos de acordo com o grupo alocado.

Também foram utilizados animais sem infecção, com a mesma idade dos infectados que receberam os tratamentos para as análises de toxicidade dos compostos.

Um grupo de animais não infectados e sem tratamento, com a mesma idade dos demais que foi utilizado como grupo controle.

Dois grupos, sem infecção foram utilizados como controle positivo dos ensaios de toxicidade pela indução de micronúcleo em medula óssea pelo tratamento com doxorrubicina e o ensaio de indução de focos de criptas aberrantes em intestino grosso pelo tratamento com 1,2-Dimetilhidrazina (DMH).

Os grupos experimentais e número de animais utilizados em cada ensaio estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Grupos de experimentos *in vivo*

Forma	Total animais	Grupo	Substância	Dose/Intervalo/Via/Veículo
Promastigota	6	Tratados GLU	Glucantime®	50mg/Kg/24/24h/IP em PBS
Amastigota	6			
Promastigota	6	Tratados HDAB	HDAB	50mg/Kg/24/24h/VO em 0,5% CMC
Amastigota	6			
Não infectados	6			
Promastigota	6	Tratados GE	GE	50mg/Kg/24/24h/VO em 0,5% CMC
Amastigota	6	Tratados GE	GE	25mg/Kg/12/12h/VO em 0,5% CMC
Não infectados	6			
Promastigota	4	Tratados Associação 75/25	75% HDAB	37,5mg/24/24h
			25% GE	+
Amastigota	6	Tratados Associação 75/25	75% HDAB	37,5mg/Kg/24/24h
Não infectados	6		25% GE	+
Promastigota	4	Tratados Associação 50/50	50% HDAB	25mg/Kg/24/24h
			50% GE	+

Continua

Amastigota	6	Tratados Associação 50/50	50% HDAB	25mg/Kg/24/24h +
Não infectados	6		50% GE	12,5mg/Kg/12/12h/VO em 0,5% CMC
Promastigota	4	Tratado Associação 25/75	25% HDAB	12,5mg/Kg/dia +
			75% GE	37,5mg/Kg/24/24h/VO em 0,5% CMC
Amastigota	6	Tratado Associação 25/75	25% HDAB	12,5mg/Kg/24/24h +
Não infectados	6		75% GE	18,75mg/Kg/12/12h/VO em 0,5% CMC
Promastigota	6	Não Tratado	-	-
Amastigota	6			
Não infectados	5	Tratado DMH	DMH	20mg/Kg/Dose única/SC
Não infectados	5	Tratado Doxorrubicina	Doxorrubicina	20mg/Kg/dose única/IP
Não infectados	6	Controle	-	-

NOTA: IP: via intraperitoneal. VO: via oral. SC: via subcutânea. CMC: carboximetilcelulose. DMH: 1,2-Dimetilhidrazina.

Um dia após o fim do tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, e colhido sangue por via intracardíaca, que foi centrifugado para obtenção das amostras de soro que foram armazenadas em freezer para os testes bioquímicos. Seguido da remoção do fígado, baço e demais tecidos (rim, pulmão, coração, intestino grosso e medula óssea) para determinação da carga parasitária, expressão de citocinas, estudo histopatológico e ensaios de toxicidade.

O presente projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.03.16, sob o protocolo nº 015/16. Anexo A e B.

5.5.1 Extração de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* e síntese de cDNA

Os fragmentos de fígado e baço foram removidos e pesados (aproximadamente

50mg) com auxílio de material cirúrgico estéril. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos de 1,5mL estéreis e congelados imediatamente a -80°C para posterior extração de RNA. Amostras dos fragmentos foram processadas conforme protocolo básico de extração de RNA com colunas de afinidade. Os fragmentos foram congelados e mantidos a -80°C , macerados ainda congelados e lisados com tampão específico do kit (Invitrap Spin Cell RNA mini kit). Após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído por colunas de afinidade e congelado imediatamente. As amostras de RNA foram dosadas em Nanodrop ND2000 e ajustadas para uma concentração de 500ng. A seguir, essas amostras foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de 11,0 μL do RNA, foi adicionado 1,0 μL de uma mistura contendo os quatro dNTP's, 1,0 μL de random primers de acordo com o protocolo do fabricante do kit. Em seguida as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a 65°C . Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos, seguido da adição das misturas, 2 μL de DTT e o 4 μL tampão (Tris-HCl, 250mM, pH 8,3; KCl, 375mM; MgCl_2 , 15mM) e colocado novamente no termociclador por 20 segundos a 37°C . Após os 20 segundos, foi adicionado 1,0 μL da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), que é a responsável para a complementação do RNA para cDNA, seguido de um ciclo de 37°C durante 50 minutos. Ao final da reação as amostras foram congeladas até o momento da realização dos ensaios de PCR.

O grau de pureza das amostras foi analisado no Nanodrop ND2000 pela da medida da absorvância 260/280 (SAMBROOK J, FRITSCH E, 1989). Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese, as amostras foram congeladas a -20°C para o posterior uso em PCR quantitativo em tempo real.

5.5.2 Determinação da carga parasitária no fígado e baço pela qPCR (Linj31)

Para a qPCR foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas utilizando os iniciadores Linj31 conforme Colombo (2011). Para a avaliação do tratamento pela qPCR foi utilizada a curva padrão para determinar o número absoluto de parasitos presentes por mg de amostra (COLOMBO et al., 2017). O valor do C_T (Cycle threshold) obtido pela qPCR foi plotado na curva padrão para a obtenção do número de

parasitos (COLOMBO et al., 2015). Assim foi possível determinar a resposta aos tratamentos nos diferentes grupos pela comparação entre os resultados dos compostos e o grupo de animais não tratados.

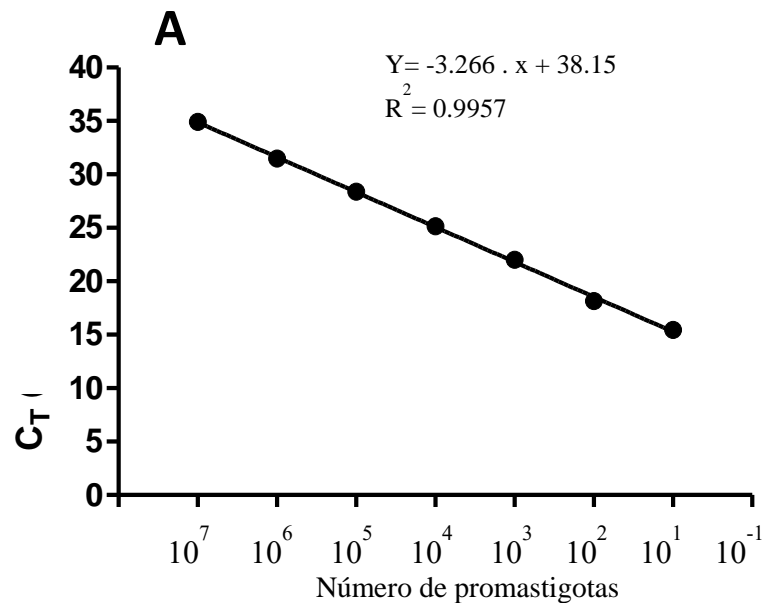


Figura 5 - Curva padrão de promastigotas para o iniciador LinJ31

5.5.3 Avaliação da expressão relativa de citocinas por qPCR

O ensaio para avaliar a expressão gênica das citocinas (IL-10; IL-4, $TGF\beta$, IFN- γ , IL-17 e $TNF\alpha$) foi realizado a partir do material obtido dos fragmentos de baço e fígado dos animais que submetidos à extração de RNA e posterior transformação para cDNA para a realização das análises em PCR em Tempo Real, utilizando a metodologia sondas de hidrólise do tipo Taqman duplamente marcada com os fluoróforos específicos, para que seja possível a quantificação da expressão relativa das citocinas tendo como gene normalizador uma microglobulina de hamster obtida da sequência de genes Genbank.

Os primers foram desenhados utilizando o Software Primer Blast. As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados neste estudo foram obtidas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os primers que foram produzidos pela

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) e suas sequências estão demonstradas na tabela 4, segundo DA SILVA et al., (2020).

Tabela 4 - Sequências de primers

IL-10

Primer 1: CCA GCT GGA CAA CAT ACT ACT C

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

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

IL-4

Primer 1: GAA GAA CTC CAC GGA GAA AGAC

Primer 2: GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT A

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

TGF- β

Primer 1: GGC AGC TGT ACA TCG ACT TT

Primer 2: GAC AGA AGT TGG CGT GGT AG

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

IFN- γ

Primer 1: GAG GAG CAT AGA CAC CAT CAA G

Primer 2: CCT GAA GGT CAT TTA CCG GAA T

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

IL-17

Primer 1: CTC CAG CAG CAA CTC TTC TT

Primer 2: TCT TCT GTT GCT GGT CTC TTG

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

TNF- α

Primer 1: GGT TTA CTC CCA GGT TCT CTT C

Primer 2: GGA CAG GAG GTT GAC GTT AT

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

MG (Microglobulina, gene constitutivo de hamster)

Primer 1: GGT CTT TCT ATC TCT TGG CTC A

Primer 2: CTT GGG CTC CTT CAG AGT TAT G

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

As reações foram realizadas em um Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 10 μ L por reação. Foi adicionado 0,5 μ L de uma mistura

que inclui os marcadores forward, reverse, e a sonda TaqMan, marcada com FAM para as citocinas e HEX para o gene constitutivo, utilizando NFQ como quencher na placa. Em seguida foi preparado um mix contendo 5 μL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 3,5 μL de água livre de DNase e RNase e 1 μL de cDNA das amostras, que foram homogeneizados ao mesmo tempo para todos os marcadores, para que todos estivessem com a mesma concentração final de cDNA, e então adicionados à placa. Foi utilizado um controle negativo para cada marcador. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos. A segunda etapa foi um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto

Os resultados foram expressos pelo método ΔCt (delta *Cycle Thresold*) que consiste de uma quantificação relativa, onde é realizada a normalização de expressão de cada alvo pela subtração do valor de Ct encontrado para cada citocina, pelo valor do Ct do gene constitutivo, conforme Da Silva et al., 2020.

5.6 Estudo histopatológico

Foram colhidos fragmentos de baço, fígado, rim, pulmão e coração, que foram acondicionados em solução de formalina tamponada 10%, seguido do processamento de técnicas usuais de histologia. Os cortes histológicos de 5 μm foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e observados à microscopia óptica para análise das alterações nos tecidos. A análise do material foi realizada sob colaboração da patologista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Dra Aurea Favero Ferreira.

5.7 Ensaio de toxicidade *in vivo*

5.7.1 Testes bioquímicos

No final do tratamento o sangue dos animais de todos os grupos foi colhido por punção cardíaca após o animal ter sido eutanasiado em câmara saturada de CO₂. Esse sangue foi colocado em microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos para a separação do soro, que foi congelado a -20 ° C para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

As amostras de soro foram utilizadas para a realização da dosagem de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), GGT (gama glutamil transferase), Ureia e Creatinina, utilizando kits comerciais da marca Labtest®. E as condições de realização foram as descritas pelo fabricante. As análises foram realizadas em aparelho Analisador Automático (Labmax 240®) no Laboratório Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento desta etapa, a metodologia teve a colaboração da professora Dra Maria Rita Rodrigues e do técnico MSc. André Luiz Machado Viana.

5.7.2 Análise de focos criptas aberrantes

O estudo foi realizado no Laboratório de Análise Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANTIN) da UNIFAL-MG. Para o desenvolvimento dessa metodologia e do teste de micronúcleo em medula óssea tivemos a colaboração da professora Dra Luciana Azevedo.

Para avaliar o potencial de toxicidade para o trato intestinal foi realizada a análise de criptas aberrantes em cólon dos grupos experimentais não infectados tratados com os compostos HDAB, 75/25, 50/50, 25/75 e GE. Como controle positivo do ensaio foi utilizado um grupo de 5 animais tratados com 1,2-Dimetilhidrazina em dose única na dose de 20mg/Kg por via subcutânea, que é uma substância capaz de induzir câncer de colón (BIRD, 1987; MA; WILLIAMSON; ROWLANDS, 2002). Os animais do grupo DMH receberam o

tratamento e após 60 dias foram submetidos a eutanásia. Como controle negativo foram utilizados os animais não infectados e sem tratamento (grupo controle).

Após a eutanásia foram removidos os cólons dos animais, que foram fixados em formalina a 10%, com todo o segmento intestinal aberto e preso em placas de isopor separados por região: cólons proximal, médio e distal, de forma a manter o posicionamento anatômico. Após 24 horas foram transferidos para uma solução de etanol a 70% seguido da coloração de cada fragmento em azul de metileno a 1%. Todos os fragmentos foram analisados em microscopia óptica em aumento de 10x. Foram feitos registros do material analisado em câmera digital colorida da marca Opton, 10MP, para avaliar se houve a formação de focos de criptas aberrantes (FCA), e caso houvesse formação desses focos, quantas criptas aberrantes (CA) continham em cada um dos focos com a classificação do número dessas criptas (1-5).

5.7.3 Teste de micronúcleo em medula óssea

Foi realizado o teste de micronúcleo (MACGREGOR et al., 1987) que consiste em verificar se o agente utilizado causa alterações cromossômicas, que são visualizadas em eritrócitos policromáticos (PCE). Para isso foi colhido material de medula óssea dos animais dos grupos não infectados, tratados com os compostos HDAB, 75/25, 50/50, 25/75 e GE. Como controles do ensaio foram utilizados 5 animais não infectados, tratados com 20mg/Kg de Doxorubicina por via intraperitoneal em dose única para o grupo controle positivo, que foi submetido a eutanásia 24 horas após o tratamento. Para o controle negativo foram colhidos materiais de 6 animais do grupo não infectado e sem tratamento (grupo controle).

Após a eutanásia, foram removidos os dois fêmures dos animais e suas extremidades seccionadas para a introdução de 3mL de soro fetal bovino (SFB), com o auxílio de seringa de 5mL e agulha 13x0,45mm, e o conteúdo da medula óssea colhido em tubo cônico de 15mL estéril. Em seguida esse material foi centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm, descartado o sobrenadante e o sedimento ressuspendido em 500µL de SFB. Foram confeccionados esfregaços com o material obtido em lâminas de vidro, secos e coradas com

o método de May-Grunwald Giemsa e analisados em microscopia óptica com aumento de 100x.

Foram confeccionadas duas lâminas por animal e contados 2000 PCEs por animal, o número de PCEs contendo micronúcleos e o total de eritrócitos normocromáticos (NCE) presentes durante a contagem do número de PCEs.

5.8 Análise estatística

Para testar a normalidade, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, em seguida prosseguiu-se com a comparação de dados dois a dois (grupo tratado versus não tratado; grupo tratado versus controle; grupo não tratado versus controle), utilizando-se o teste de Mann Whitney (não-pareado, bicaudal). Para os experimentos de micronúcleos, foi utilizado o teste ANOVA (One way). As análises foram realizadas no Software GraphPad Prism, versão 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Para todas as análises foi considerado o nível significância com $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Resultados *in vitro*

6.1.1 Avaliação da Atividade contra formas promastigotas

Após a incubação dos compostos e da Anfotericina B com as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi determinado que o melhor tempo de incubação foi o de 48 horas para ambos os compostos, devido a problemas de degradação dos compostos em diferentes tempos. Assim, foram determinadas as concentrações efetivas 50% (CE₅₀) para cada situação após uma curva de regressão linear, conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de CE₅₀ em promastigotas

Substância	CE ₅₀
HDAB	33,38 µg/mL
GE	41,35 µg/mL
Anfotericina B	0,37 µg/mL

6.1.2 Determinação das interações entre os compostos *in vitro* contra promastigotas

Os resultados de CE₅₀ e CIF da combinação dos compostos HDAB e GE em promastigotas estão demonstrados na tabela 6. A curva de dose resposta das combinações está representada na figura 6. O isoblograma referente a CIF das combinações está na figura 7. As interações foram classificadas como indiferente/aditivo de acordo com a $\bar{X}\Sigma$ CIF e de acordo com o isoblograma, pois pode-se analisar que todos os pontos (correspondentes as combinações 4:1, 3:2, 2:3, 1:4) ficaram próximos à linha de atividade.

Tabela 6 - Valores de CE50, CIFs, Σ CIF, $\bar{\Sigma}$ CIF das associações entre HDAB e GE em promastigotas

Associação	CE50 da Associação		CIF da associação		Σ CIF	$\bar{\Sigma}$ CIF
	HDAB	GE	HDAB	GE		
5:0	33,38	-	-	-	-	1,67
4:1	32,36	8,48	1,03	0,21	1,23	
3:2	37,83	26,42	1,20	0,64	1,84	
2:3	26,67	41,91	0,85	1,01	1,86	
1:4	13,24	55,47	0,42	1,34	1,76	
0:5	-	41,35	-	-	-	

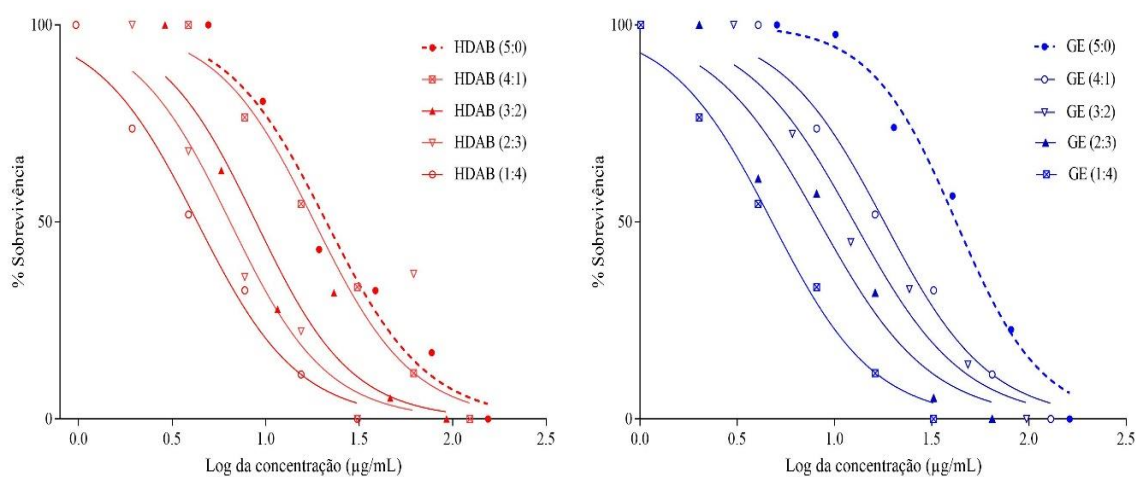


Figura 6 - Curvas de dose resposta de CE50 da associação entre HDAB e GE em promastigotas

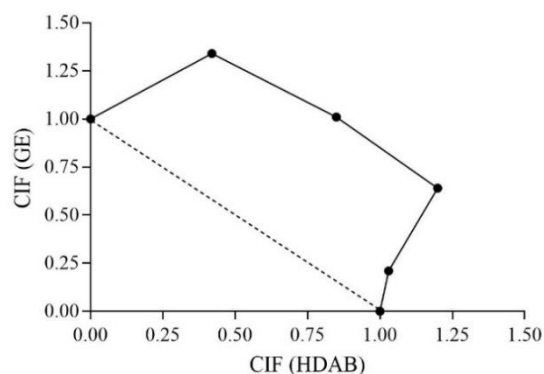


Figura 7 - Isoblograma referente aos valores de CIF das combinações de HDAB e GE em promastigotas

6.1.3 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais

Após a realização dos experimentos, foi possível calcular o valor das concentrações citotóxicas a 50% das células (CC50) através da construção de uma curva de regressão linear. A tabela 7 demonstra os valores encontrados de toxicidade para os tratamentos de cada substância isoladamente, já a tabela 8 demonstra os resultados da combinação dos compostos.

Tabela 7 - Valores de CC50 em macrófagos peritoneais de hamsters

Substância	CC ₅₀
HDAB	70,29 µg/mL
GE	67,68 µg/mL
Anforericina B	93,88 µg/mL

Tabela 8 - Valores de CC50 das associações entre HDAB e GE em macrófagos peritoneais de hamsters

Associação	CC50 da Associação	
	HDAB	GE
5:0	70,29	-
4:1	40,78	21,66
3:2	22,31	25,52
2:3	16,24	15,58
1:4	5,17	7,211
0:5	-	67,68

6.1.4 Avaliação da Atividade contra formas amastigotas intracelulares

Após a incubação dos compostos e da anfotericina B em amastigotas intracelulares foram determinados os valores de CE₅₀ para cada substância.

Na tabela 9 estão descritos todos os resultados isoladamente dos tratamentos e o índice de seletividade encontrado para cada forma do parasito (promastigotas e amastigota).

Tabela 9 - Valores de CE₅₀ em amastigotas intracelulares

Substância	CE ₅₀
HDAB	9,78 µg/mL
GE	8,83 µg/mL
Anforericina B	0,08 µg/mL

A tabela 10 demonstra um resumo com todos os resultados encontrados e os respectivos índices de seletividade.

Tabela 10 - Resumo dos resultados e índice de seletividade aos tratamentos

Substância	CE ₅₀	CE ₅₀	CE ₅₀	CE ₅₀	CC ₅₀	CC ₅₀	IS	
	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)	Promastigota	Amastigota
	Promastigota		Amastigota		Macrófago		Promastigota	Amastigota
HDAB	33,38	118,28	9,78	34,66	70,29	249,08	2,11	7,19
GE	41,35	209,89	8,83	44,82	67,68	343,55	1,64	7,66
Anforericina B	0,37	0,4	0,08	0,087	93,88	101,59	253,72	1173,50

NOTA: IS: índice de seletividade

6.2 Farmacocinética

O método desenvolvido para a quantificação de HDAB e GE foi utilizado para amostras de plasma de hamsters não infectados. Os valores obtidos estão demonstrados nas figuras 8 e 9, e na tabela 9. Após cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (MS/MS), os perfis farmacocinéticos foram construídos usando escala logarítmica, sendo que foram comparadas as diferenças estatísticas entre o perfil de resultado do grupo de tratamento isoladamente (HDAB ou GE) e o seu perfil em associação (HDAB com GE), pois para que cada composto fosse analisado nessa metodologia, foi necessária uma padronização diferente devido às características químicas de cada composto.

Para o HDAB não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos sem associação e com associação nos parâmetros de área sobre a curva (AUC), tempo de meia vida, *clearance* total aparente, tempo máximo para atingir o pico de concentração e concentração plasmática máxima, indicando que a associação não interferiu na metabolização e na eliminação desse composto.

Para o GE, foram encontradas diferenças significativas no tratamento com associação com um aumento da área sobre a curva (362,01 vs 139,08 h.ng/mL) em relação ao grupo sem a associação (p=0,015). Não houve diferença entre os tempos de meia vida entre os dois grupos. Houve aumento do *clearance* plasmático no grupo sem associação em relação ao grupo com associação (0,11 vs 0,6 L/h/Kg) (p=0,015). Em relação ao tempo máximo para atingir o pico de concentração máxima foi maior para o grupo com associação (1,39 vs 0,45) em comparação ao grupo sem associação (p=0,026), e a para concentração máxima não

foram encontradas diferenças estatísticas. Podendo indicar que a associação favoreceu uma maior disponibilidade por um tempo mais prolongado do GE no plasma (AUC e $t_{m\acute{a}x}$) e diminuiu o tempo de sua eliminação no plasma (Cl_{Tf}).

Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após a administração oral sem associação de HDAB (15mg/Kg) e GE (15mg/Kg), e a associação de GE (15mg/Kg) com HDAB (15mg/Kg) (n=6 por grupo). Mediana; intervalo de confiança de 95% (IC95%)

Parâmetro	HDAB		GE	
	Sem associação	Com associação	Sem associação	Com associação
AUC (h.ng/mL)	7304,20 (1505,9 - 13938)	13.580 (2.943,5 - 19.510)	139,08 (79,76 - 161,68)	362,01 (135,65 - 677,04)*
$t_{1/2}$ (h)	7,69 (2,33 - 13,05)	8,50 (0,98 - 25,28)	1,07 (0,5 - 7,2)	1,01 (0,47 - 1,81)
Cl_{Tf} (L/h/Kg)	2732,7 (1.119,3 - 4.346,1)	1.084,4 (345,98 - 3.108,2)	0,11 (0,08 - 0,21)	0,06 (0,02 - 0,09)*
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	0,30 (0,23 - 0,41)	0,28 (0,21 - 0,39)	0,45 (0,05 - 0,99)	1,39 (0,55 - 2,51)*
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	383,89 (263,63 - 591,47)	318,94 (296,38 - 354,30)	37,00 (8,58 - 137,21)	115,80 (20,28 - 245,12)

NOTA: AUC: área sob a curva; $t_{1/2}$: tempo de meia vida; Cl_{Tf} clearance total aparente; $t_{m\acute{a}x}$: tempo máximo de concentração e $C_{m\acute{a}x}$: concentração plasmática máxima. Teste de Mann-Whitney; *p<0,05.

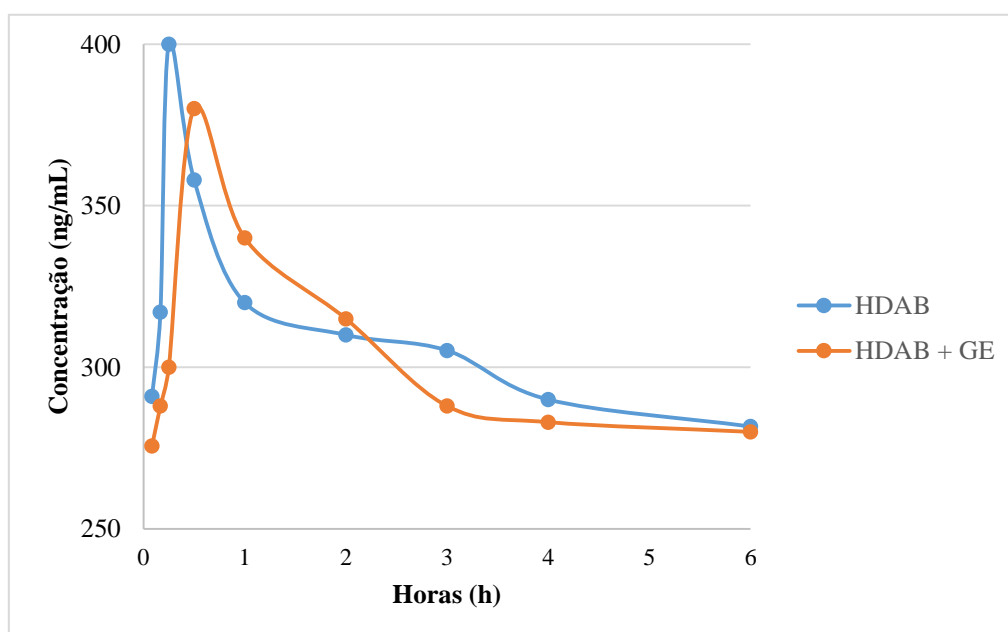


Figura 8 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para HDAB com e sem associação

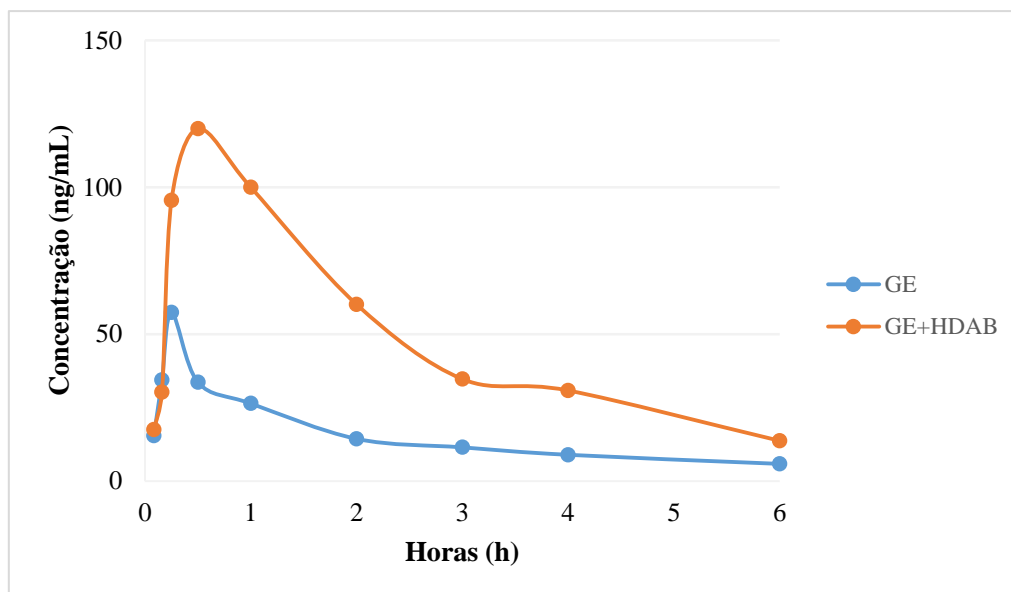


Figura 9 - Curva da concentração plasmática versus o tempo para GE sem e com associação

6.3 Experimentos *in vivo*

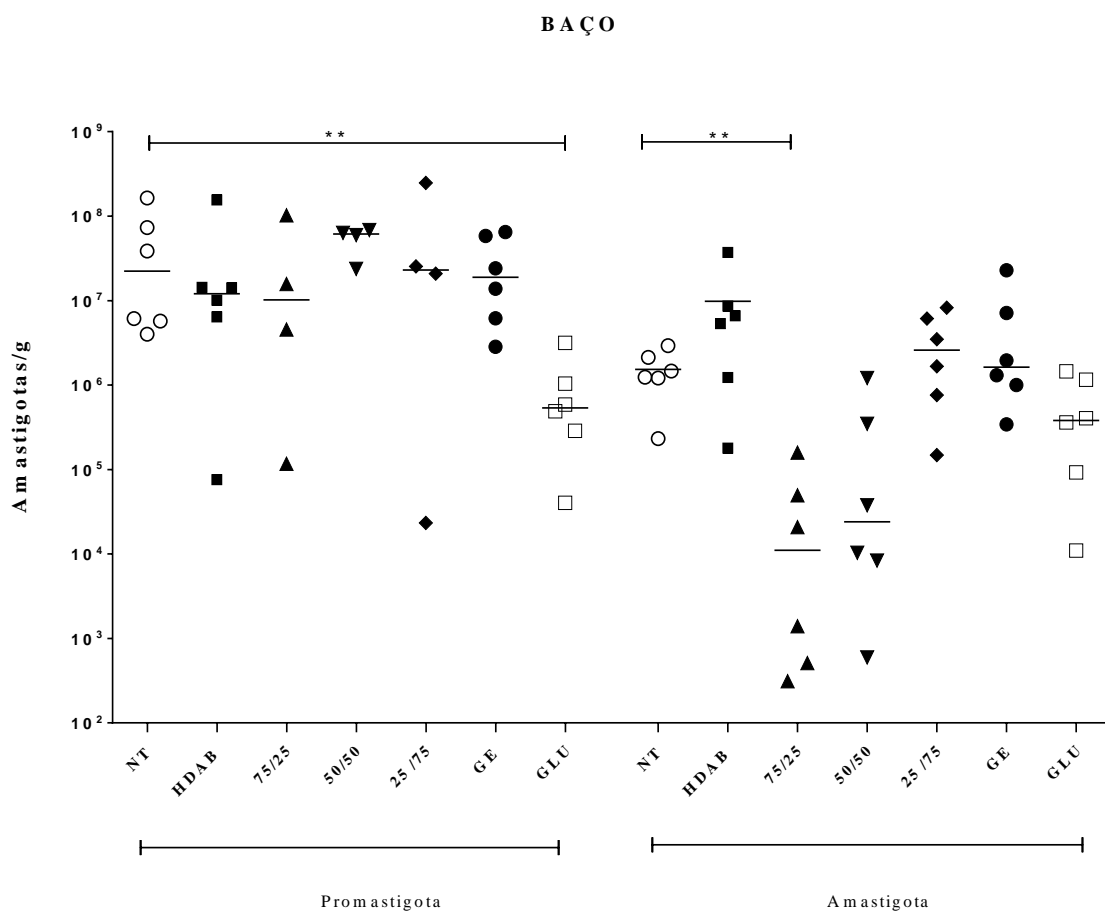
Após a realização dos testes em hamsters infectados com *L. (L). infantum chagasi* foi possível demonstrar uma taxa de sobrevivência de 100% em todos os animais nos diferentes grupos experimentais.

6.3.1 Avaliação da carga parasitária

A avaliação da carga parasitária foi realizada qPCR (Linj31) no fígado e no baço dos animais dos diferentes grupos de tratamento e de infecção. Para os grupos infectados com formas promastigotas, houve redução da carga parasitária, com diferença estatística significativa entre os animais do grupo tratado com Glucantime® em comparação com o grupo não tratado, tanto no baço, quanto no fígado. Para os animais infectados com formas amastigotas houve redução da carga parasitária, com diferença estatística significativa entre os animais do grupo tratado com associação 75/25 em comparação com o grupo não tratado

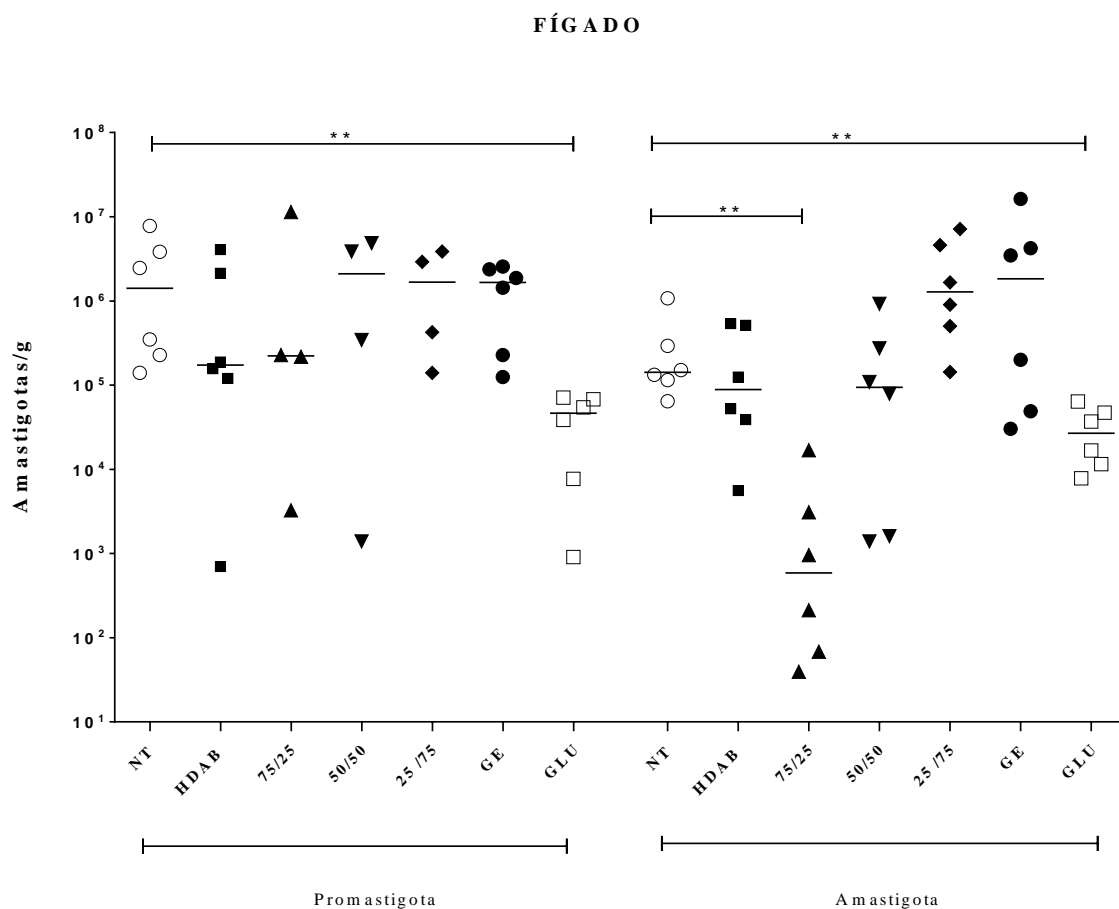
no baço. Já no fígado, houve redução da carga parasitária, com diferença estatística significativa entre os animais do grupo tratado com Glucantime® em comparação com o grupo não tratado, e do grupo 75/25 em comparação com o grupo não tratado. Os resultados e diferenças estatísticas estão demonstrados no gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de baço de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais



NOTA: NT: grupo infectado não tratado; HDAB (100%); 75/25 (HDAB 75% + GE 25%); 50/50 (HDAB 50% GE 50%); 25/75 (HDAB 25% + GE 75%); GE (100%); GLU: Glucantime®. **p<0,01 Teste de Mann Whitney.

Gráfico 2 - Carga parasitária avaliada por número de amastigotas por grama de fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* determinado por qPCR nos diferentes grupos experimentais



NOTA: NT: grupo infectado não tratado; HDAB (100%); 75/25 (HDAB 75% + GE 25%); 50/50 (HDAB 50% + GE 50%); 25/75 (HDAB 25% + GE 75%); GE (100%); GLU: Glucantime. ** $p < 0,01$ Teste de Mann Whitney.

6.3.2 Avaliação da expressão de mRNA das citocinas IL-10; IL-4, TGF β , IFN- γ , IL-17 e TNF α .

Foi realizada a qPCR para a determinação das citocinas no baço e fígado dos animais infectados com formas promastigotas, com formas amastigotas e grupo controle.

Os resultados do perfil de citocinas determinadas no baço estão demonstrados nas figuras 10 e 11 e foi possível analisar que para IL-10, nos grupos infectados com formas promastigotas, foi observada uma maior expressão, com diferença significativa, apenas do grupo HDAB em relação ao grupo controle. Para os grupos infectados com formas

amastigotas, observou-se maior expressão do grupo HDAB em relação ao grupo não tratado, bem como maior expressão em relação ao grupo controle. Também foi observado maior expressão do grupo 25/75 em comparação ao grupo não tratado e do grupo GE em relação ao grupo não tratado.

Para IL-4, nos grupos infectados com formas promastigotas, todos os grupos infectados apresentaram maior expressão, com diferença estatística, somente em relação ao grupo controle. Para os grupos infectados com formas amastigotas, foi possível verificar uma diferença significativa, com menor expressão do grupo HDAB em comparação ao grupo não tratado e comparado ao grupo controle. Observou-se também menor expressão do grupo 75/25 em comparação aos grupos não tratado e grupo controle. Para o grupo 25/75 houve uma maior expressão em relação aos grupos não tratado e controle. No grupo GE verificou-se uma maior expressão em relação ao grupo não tratado, e para o grupo Glucantime[®] houve maior expressão em relação ao grupo não tratado.

Para TGF- β no grupo infectado com formas promastigotas, houve uma menor expressão para o grupo Glucantime[®] em relação ao grupo controle. Nos grupos infectados com formas amastigotas houve uma menor expressão no grupo HDAB em relação aos grupos não infectados e grupo controle. No grupo 50/50 observou-se uma maior expressão em comparação aos grupos não tratado e controle. Para o grupo 25/75 houve maior expressão em relação ao grupo não tratado, e no grupo GE uma maior expressão em relação ao grupo não tratado.

Para de IFN- γ , nos grupos infectados com formas promastigotas, houve uma maior expressão em todos os grupos de tratamento (HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) em comparação ao grupo não tratado, bem como maior expressão do grupo controle em relação ao grupo não tratado. Nos grupos infectados com formas amastigotas observou-se uma maior expressão do grupo HDAB em relação ao grupo não tratado. Para o grupo 75/25 houve uma menor expressão em comparação aos grupos não tratado e controle. Para o grupo 50/50 houve uma menor expressão comparado ao grupo controle. No grupo GE observou-se uma menor expressão em relação ao grupo controle. No grupo Glucantime[®] menor expressão em relação ao grupo controle, e finalmente no grupo controle houve maior expressão em relação ao grupo não tratado.

Para TNF- α , nos grupos infectados com formas promastigotas, houve diferença significativa, com maior expressão do grupo HDAB em comparação aos grupos não tratado

e grupo controle. Nos grupos infectados com formas amastigotas, foi possível observar no grupo HDAB uma menor expressão em comparação aos grupos não tratado e grupo controle. No grupo 25/75 houve uma maior expressão em relação ao grupo controle e para o grupo Glucantime[®] maior expressão em comparação ao grupo controle.

Para IL-17 nos grupos infectados com formas promastigotas, todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) apresentaram maior expressão em comparação ao grupo controle. Nos grupos infectados com formas amastigotas, verificou-se que no grupo HDAB houve menor expressão em comparação ao grupo controle. Para o grupo 50/50 uma menor expressão em relação ao grupo controle. No grupo 25/75 observou-se maior expressão em comparação ao grupo controle. Para o grupo Glucantime[®] houve uma maior expressão em relação ao grupo não tratado. Bem como o grupo controle apresentou menor expressão em comparação ao grupo não tratado.

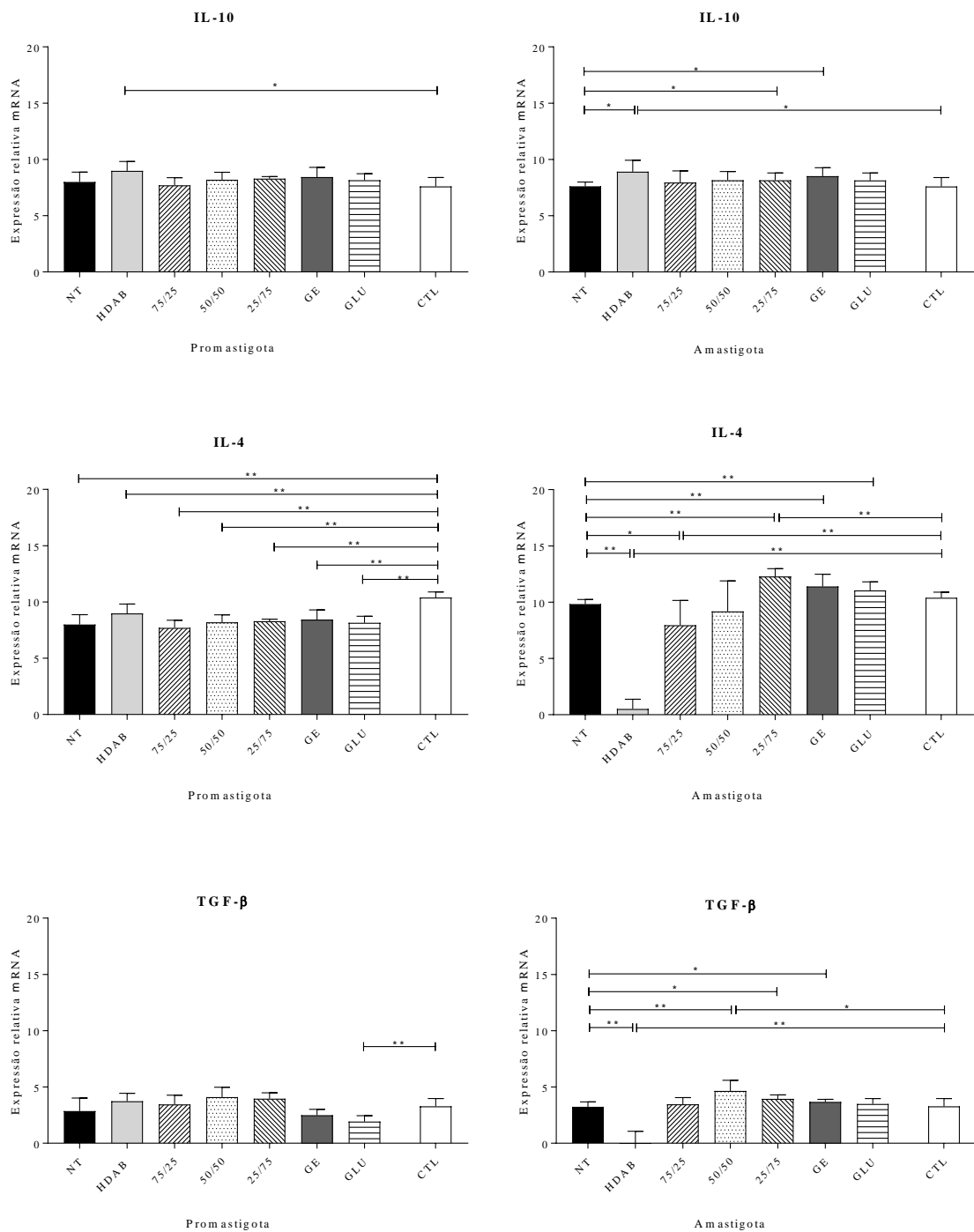


Figura 10 - Expressão relativa de mRNA de citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β em baço de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas e grupo controle

NOTA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ pelo teste de Mann Whitney.

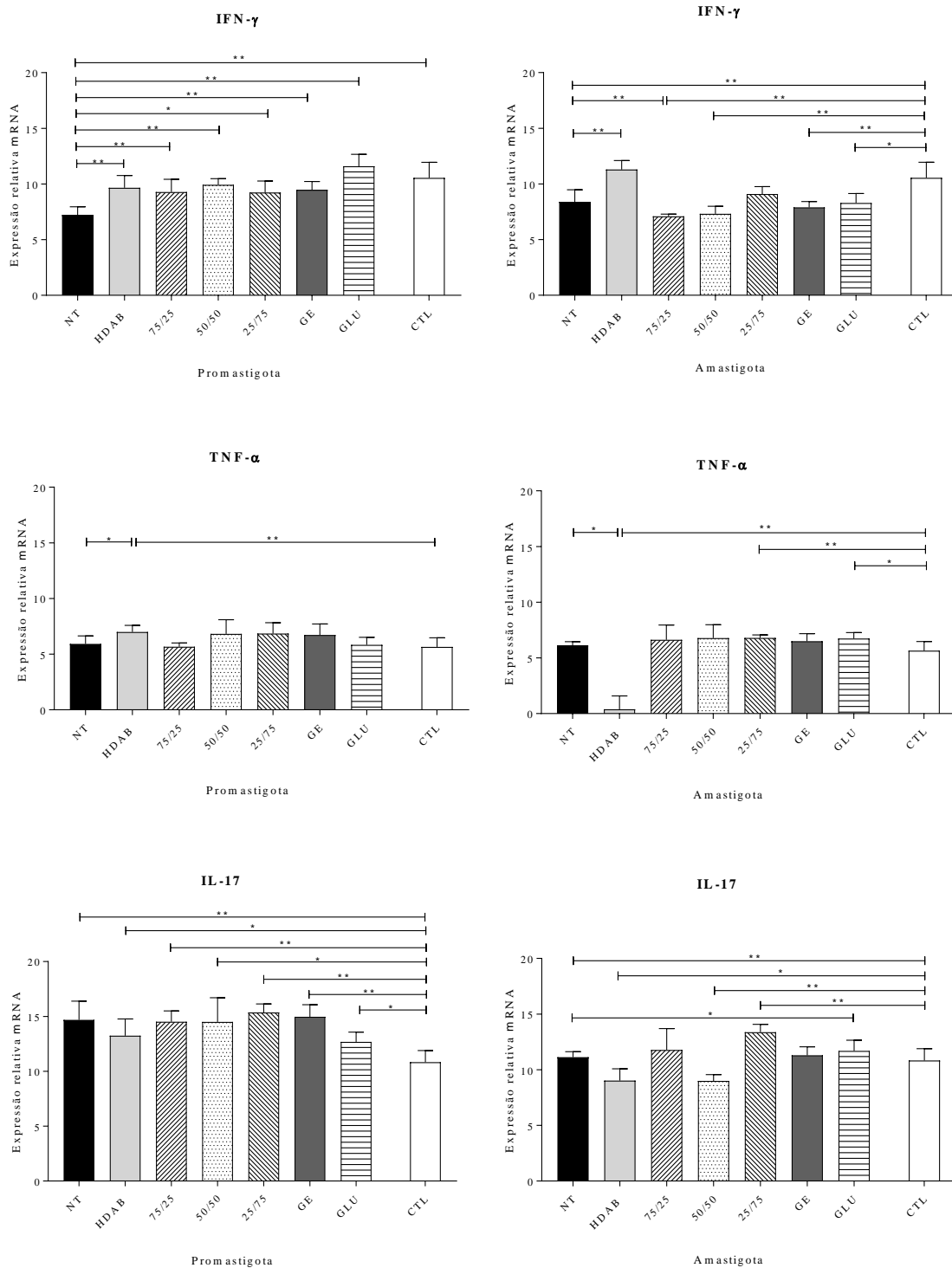


Figura 11 - Expressão relativa de mRNA de IFN- γ , TNF- α e IL-17 em baço de hamsters infectados com formas promastigotas e amastigotas e grupo controle

NOTA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ pelo teste de *Mann Whitney*.

Os resultados do perfil de citocinas determinadas no fígado estão demonstrados nas figuras 12 e 13 e foi possível analisar que para IL-10, nos grupos infectados com formas promastigotas, todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) apresentaram maior expressão em comparação ao grupo controle. Para os grupos infectados com formas amastigotas, houve o mesmo perfil, com todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) com maior expressão em comparação ao grupo controle.

Para IL-4, nos grupos infectados com formas promastigotas, todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) apresentaram maior expressão em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, para os grupos infectados com formas amastigotas, todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) tiveram maior expressão em comparação ao grupo controle.

Para TGF- β no grupo infectado com formas promastigotas, todos os grupos infectados (não tratado, HDAB, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®]) apresentaram maior expressão em comparação ao grupo controle. Sendo que os grupos 75/25 e Glucantime[®] tiveram maior expressão em comparação ao grupo controle não tratado.

Para de IFN- γ , nos grupos infectados com formas promastigotas, houve uma menor expressão nos grupos não tratado e Glucantime[®] em comparação ao grupo controle. Nos grupos infectados com formas amastigotas, os grupos não tratado, 75/25, 50/50, 25/75, GE e Glucantime[®] apresentaram menor expressão em comparação ao grupo controle.

Para TNF- α , nos grupos infectados com formas promastigotas não houve diferença estatística significativa para nenhum dos grupos. Nos grupos infectados com formas amastigotas, foi possível observar no grupo HDAB uma menor expressão em comparação aos grupos não tratado e grupo controle.

Para IL-17 nos grupos infectados com formas promastigotas, o grupo 75/25 apresentou maior expressão em comparação aos grupos não tratado e controle. Para o grupo 50/50 houve maior expressão em relação ao grupo não tratado. O grupo GE apresentou maior expressão em comparação aos grupos não tratado e grupo controle. Nos grupos infectados com formas amastigotas, verificou-se que no grupo 75/25 houve menor expressão em comparação aos grupos não tratado e grupo controle. No grupo 25/75 observou-se menor expressão em comparação não tratado.

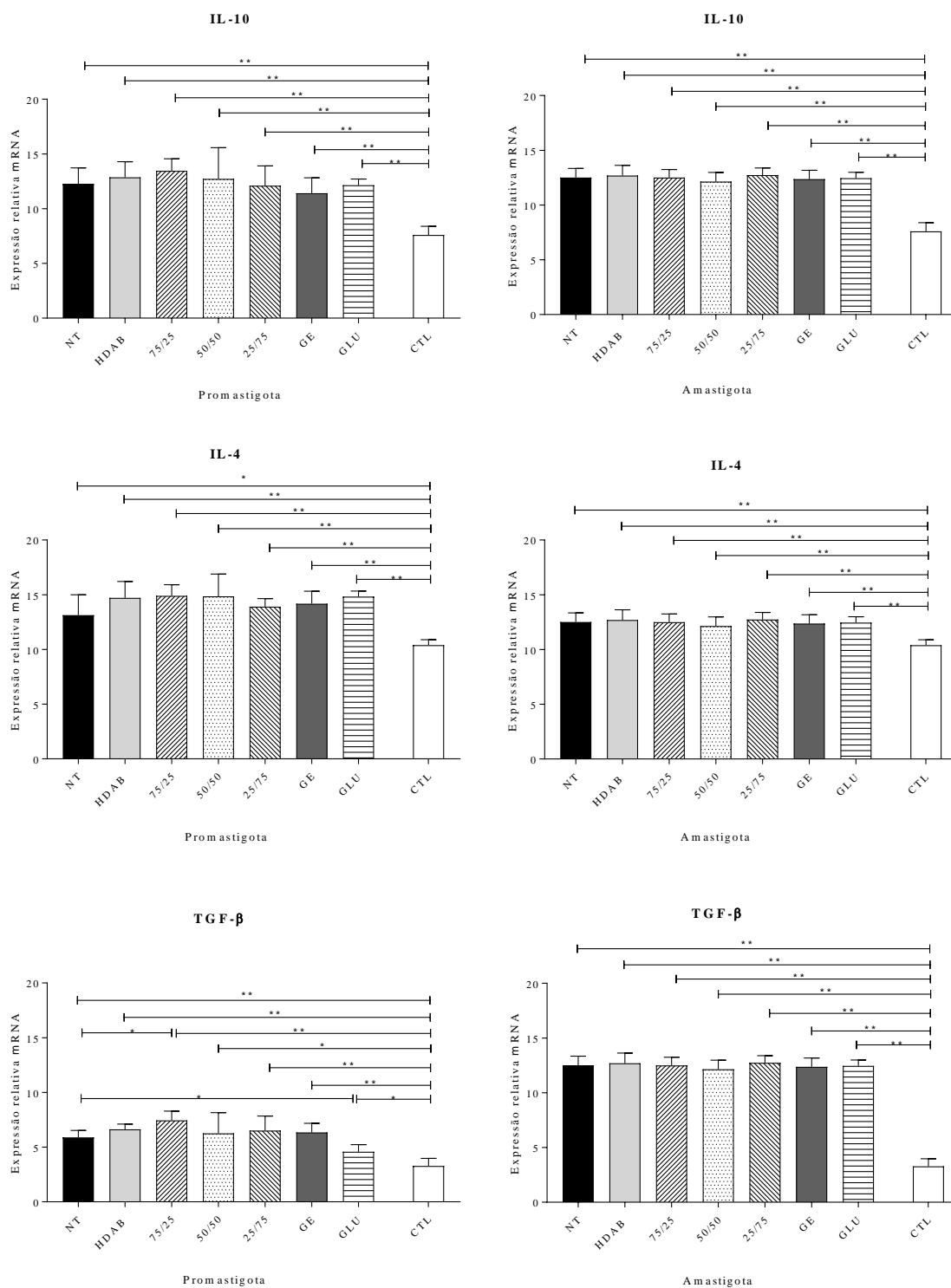


Figura 12 - Expressão relativa de mRNA de citocinas IL-10, IL-4 e TGF-β em fígado de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas e grupo controle

NOTA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ pelo teste de Mann Whitney.

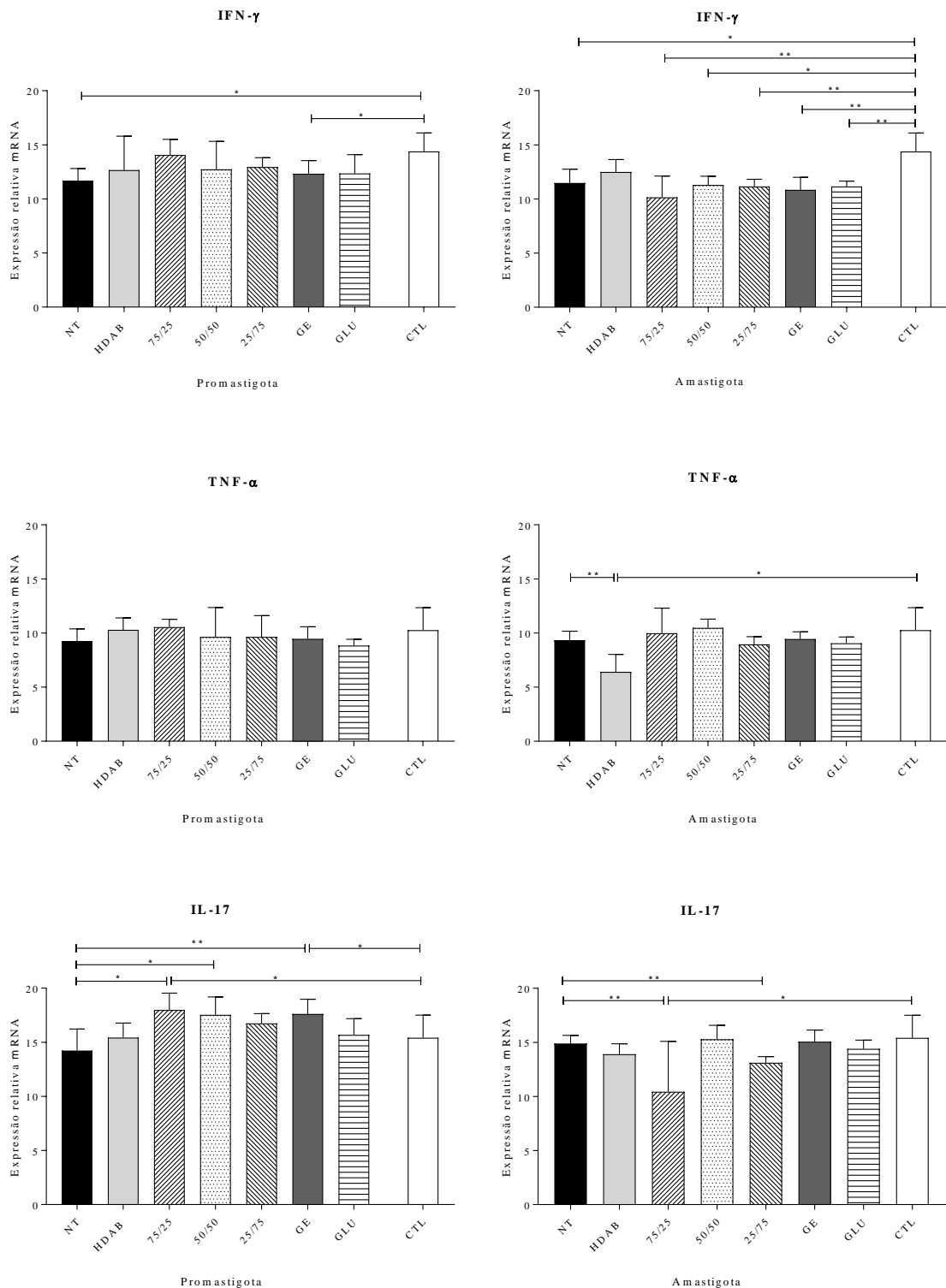


Figura 13 - Expressão relativa de mRNA de IFN- γ , TNF- α e IL-17 em fígado de hamsters infectados com formas promastigotas e amastigotas e grupo controle

Nota: *p<0,05; **p<0,01 pelo teste de Mann Whitney

6.3.3 Histopatológico

As fotomicrografias dos órgãos encontram-se nos apêndices.

6.3.3.1 Baço

Nas análises histológicas do grupo controle não foram observadas alterações em polpa branca e polpa vermelha.

Nos animais infectados com formas promastigotas do grupo NT, observou-se a presença moderada de hiperplasia dos folículos linfoides na polpa branca e aumento moderado do número de macrófagos formando nódulos na polpa vermelha. Os infectados com amastigotas apresentaram leve hiperplasia dos folículos linfoides na polpa branca e intenso aumento de macrófagos formando nódulos na polpa vermelha e intenso parasitismo.

Nos grupos tratados com HDAB, para os infectados com promastigotas, foi observada hiperplasia linfoide reacional em polpa branca, aumento moderado no número de macrófagos com quantidade moderada de nódulos na polpa vermelha. O grupo infectado com amastigotas, leve hipoplasia de folículos linfoides em polpa branca, intenso número de macrófagos e formação moderada de nódulos em polpa vermelha. O grupo não infectado apresentou leve hiperplasia de polpa branca e discreto aumento de macrófagos e linfócitos em polpa vermelha.

Para os grupos tratados com 75/25, nos infectados com promastigotas, foi observada discreta hiperplasia de folículos linfoides em polpa branca, e em polpa vermelha observou-se aumento moderado do número de macrófagos com formação de nódulos contendo parasitos e presença de congestão. Para os infectados com amastigotas a polpa branca encontra-se em condições de normalidade, e polpa vermelha com discreto aumento de macrófagos e linfócitos. O grupo não infectado apresentou condições de normalidade em polpa branca e discreto aumento de macrófagos e linfócitos em polpa vermelha.

Nos grupos tratados com 50/50, infectados com promastigotas, foi observada discreta hiperplasia de folículos linfoides em polpa branca, aumento intenso do número de macrófagos e linfócitos formando nódulos, e presença de congestão em polpa vermelha. Para

os infectados com amastigotas, leve hiperplasia em polpa branca, e em polpa vermelha aumento moderado do número de macrófagos com moderada formação de nódulos. O grupo não infectado apresentou leve hiperplasia de polpa branca e discreto aumento de macrófagos e linfócitos em polpa vermelha.

Para os grupos tratados com 25/75, infectados com promastigotas, foi observada moderada hiperplasia de folículos linfóides em polpa branca, aumento intenso do número de macrófagos, formando nódulos contendo parasitos, e congestão em polpa vermelha. Os infectados como amastigotas, leve hipoplasia de folículos linfóides em polpa branca, e em polpa vermelha, aumento acentuado de macrófagos com intensa formação de nódulos. O grupo não infectado, sem alterações em polpa branca e discreto aumento de macrófagos e linfócitos em polpa vermelha.

Nos grupos tratados com GE, infectados com promastigotas, foram identificados raros focos de hiperplasia de folículos linfóides em polpa branca e aumento moderado do número de macrófagos com formação de nódulos em polpa vermelha. Os infectados com amastigotas, leve hiperplasia de folículos linfóides em polpa branca e aumento moderado do número de macrófagos com moderada formação de nódulos e presença de parasitos em polpa vermelha. O grupo não infectado, sem alterações em polpa branca e polpa vermelha.

Para os grupos tratados com Glucantime[®], infectados com promastigotas, foram observados raros focos de hiperplasia dos folículos linfóides em polpa branca e leve aumento do número de macrófagos com presença de alguns de nódulos em polpa vermelha. Os infectados com amastigotas, observou-se moderada hiperplasia de folículos linfóides em polpa branca e aumento moderado de macrófagos com presença moderada de nódulos em polpa vermelha.

6.3.3.2 Fígado

As alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais do grupo controle foram discreta presença de infiltrado inflamatório de linfócitos no espaço porta. No parênquima hepático, presença de leve infiltrado inflamatório mononuclear com presença de alguns nódulos.

Para o grupo NT, infectados com formas promastigotas, notou-se presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com formação de nódulos. No parênquima hepático presença de infiltrado inflamatório lobular moderado de linfócitos e macrófagos formando nódulos, além de hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com moderada necrose hepatocelular. O grupo infectado com amastigotas, presença intensa de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta. No parênquima hepático intenso infiltrado inflamatório lobular de linfócitos e macrófagos com intensa formação de nódulos, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer e necrose hepatocelular.

Nos grupos tratados com HDAB, para os infectados com promastigotas, observou-se moderado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com a formação de nódulos em alguns casos. No parênquima hepático, presença moderada de infiltrado inflamatório lobular e raros focos de formação de nódulos; presença de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer com alguns focos de necrose hepatocelular. Para os infectados com amastigotas, moderado infiltrado inflamatório no espaço porta. No parênquima hepático, presença moderada de infiltrado inflamatório com a presença de células gigantes e moderada formação de nódulos; presença de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer com focos de necrose hepatocelular. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações no espaço porta, e no parênquima hepático, discreto infiltrado inflamatório lobular, com raros focos de necrose hepatocelular e raríssima formação de nódulos.

Para os grupos tratados com 75/25, os infectados com promastigotas, foi observado moderado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com a formação discreta de nódulos. No parênquima observou-se infiltrado inflamatório lobular moderado de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e alguns plasmócitos formando grande quantidade de nódulos no parênquima hepático, além de hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com presença de parasitos e moderada necrose hepatocelular. Os infectados com amastigotas, no espaço porta presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes com intensa formação de nódulos. No parênquima observou-se leve infiltrado inflamatório lobular e formação moderada de nódulos. Hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com raros focos de necrose hepatocelular. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações no espaço porta, e no parênquima hepático, leve infiltrado inflamatório lobular, com alguns focos de necrose hepatocelular e formação de alguns nódulos.

Nos grupos tratados com 50/50, para os infectados com promastigotas, foi observada a presença moderada de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com moderada formação de nódulos. No parênquima hepático, presença de infiltrado inflamatório lobular moderado de linfócitos e macrófagos com formação moderada de nódulos, bem como hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com moderada necrose hepatocelular. Para os infectados com amastigotas, intenso infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com leve formação de nódulos. No parênquima hepático, presença leve de infiltrado inflamatório lobular de linfócitos e macrófagos com formação moderada de nódulos. O grupo não infectado apresentou-se com discretos focos de infiltrado inflamatório no espaço porta, e no parênquima hepático, moderado infiltrado inflamatório lobular de mononucleares, com leve formação de nódulos.

Para os grupos tratados com 25/75, infectados com promastigotas, observou-se moderado infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com moderada formação de nódulos. No parênquima presença de infiltrado inflamatório lobular moderado de macrófagos, plasmócitos e raros linfócitos, com formação moderada de nódulos com presença de parasitos, presença moderada de hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com discreta necrose hepatocelular. Para os infectados com amastigotas intenso infiltrado inflamatório mononuclear com algumas células gigantes no espaço porta com formação intensa de nódulos. No parênquima presença leve de infiltrado inflamatório lobular, com formação intensa de nódulos com presença de parasitos. Para o grupo não infectado, alguns focos inflamatórios no espaço porta, e no parênquima hepático, moderado infiltrado inflamatório lobular, com alguns focos de necrose hepatocelular e formação de nódulos.

Nos grupos tratados com GE, infectados com promastigotas, observou-se um moderado infiltrado inflamatório no espaço porta com formação discreta de nódulos. No parênquima, formação moderada de infiltrado inflamatório lobular com rara formação de nódulos. Presença de hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer e moderada presença de necrose hepatocelular. Para os infectados com amastigotas observou-se um moderado infiltrado inflamatório no espaço porta com leve formação de nódulos. No parênquima, leve formação de infiltrado inflamatório lobular mononuclear com algumas células gigantes e formação moderada de nódulos. Para o grupo não infectado, não foram encontradas alterações em espaço porta, e no parênquima hepático discretíssimo infiltrado com raríssima formação de nódulos.

Nos grupos tratados com Glucantime[®], infectados com promastigotas, observou-se presença de leve infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta com a formação de raríssimos nódulos. No parênquima, presença de discreto infiltrado inflamatório com raros nódulos, presença de hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer com raros focos de necrose hepatocelular. Para os infectados com amastigotas notou-se intenso infiltrado inflamatório mononuclear com presença de algumas células gigantes no espaço porta com leve formação nódulos. No parênquima hepático, presença moderada de infiltrado inflamatório com leve formação de nódulos.

6.3.3.3 Rim

Nas avaliações histológicas do rim dos animais do grupo controle não foram evidenciadas alterações.

Para os animais infectados com formas promastigotas do grupo NT, observou-se infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares com agressão ao epitélio tubular. No grupo infectado com formas amastigotas, foi verificado a presença de leve e focal infiltrado inflamatório mononuclear peritubular.

Para os grupos HDAB, infectados com formas promastigotas, notou-se infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares sem agressão ao epitélio tubular. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou infiltrado inflamatório mononuclear peritubular leve e focal. Para o grupo não infectado não foram encontradas alterações.

Para os grupos 75/25, infectados com formas promastigotas, foi observado infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares sem agressão ao epitélio tubular. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear intersticial e peritubular. Para o grupo não infectado, leve infiltrado inflamatório mononuclear intersticial.

Para os grupos 50/50, infectados com formas promastigotas, observou-se infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares sem agressão ao epitélio tubular. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear peritubular. Para o grupo não infectado, moderado infiltrado inflamatório mononuclear intersticial e peritubular.

Para os grupos 25/75, infectados com formas promastigotas, notou-se infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares sem agressão ao epitélio tubular. O grupo infectado com formas amastigotas, não apresentou alterações. Para o grupo não infectado, não foram encontradas alterações.

Para os grupos GE, infectados com formas promastigotas, foi verificado infiltrado inflamatório intersticial focal de linfomononucleares sem agressão ao epitélio tubular. O grupo infectado com formas amastigotas, não foram verificadas alterações. Para o grupo não infectado, não foram encontradas alterações.

Para os grupos Glucantime[®], infectados com formas promastigotas e formas amastigotas, não foram encontradas alterações.

6.3.3.4 Pulmão

Nas avaliações histológicas do pulmão dos animais do grupo controle não foram evidenciadas alterações.

Para os animais infectados com formas promastigotas do grupo NT, não foram observadas alterações estruturais. No grupo infectado com formas amastigotas, foi verificado a presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear multifocal em septo alveolar com formação de alguns nódulos.

Para os grupos HDAB, infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear em alguns focos, em septo alveolar, com formação de nódulos. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações.

Para os grupos 75/25, infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear focal em parede de septo alveolar. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações.

Para os grupos 50/50, infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou moderado infiltrado inflamatório mononuclear multifocal em septo alveolar, com a formação de nódulos e leve

infiltrado mononuclear peribrônquico. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações.

Para os grupos 25/75, infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear focal em septo alveolar. Para o grupo não infectado, presença de leve infiltrado inflamatório mononuclear septoalveolar.

Para os grupos tratados com GE, infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou moderado infiltrado inflamatório mononuclear multifocal em septo alveolar, com a formação de nódulos. Para o grupo não infectado, não foram observadas alterações.

Para os grupos tratados com Glucantime[®], infectados com formas promastigotas, não foram observadas alterações. O grupo infectado com formas amastigotas, apresentou leve infiltrado inflamatório mononuclear multifocal em septo alveolar, com a formação de nódulos.

6.3.3.5 Coração

Nas avaliações histológicas do coração dos animais do grupo controle não foram encontradas alterações.

Nos animais do grupo NT, infectados com formas promastigotas, notou-se a presença de infiltrado mononuclear leve e focal com predominância de linfócitos, sem agressão ao miocardiócito. Para o grupo infectado com amastigotas, não foram encontradas alterações.

Para os grupos tratados com HDAB, nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não se observaram alterações.

Para os grupos tratados com 75/25, nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não foram encontradas alterações estruturais.

Para os grupos tratados com 50/50, nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não foram encontradas alterações.

Para os grupos tratados com 25/75, nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não se notou alterações.

Para os grupos tratados com GE, nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não foram encontradas alterações.

Para os grupos tratados com Glucantime[®], nos grupos infectados com promastigotas, amastigotas e não infectados, não foram encontradas alterações.

Tabela 12 - Resumo das principais alterações histopatológicas encontradas nos grupos experimentais

Órgão	GRUPO	Alteração	CTL			HDAB			75/25			50/50			25/75			GE			GLU		NT	
			PRO	AMA	NI	PRO	AMA	NI	PRO	AMA	NI	PRO	AMA	NI	PRO	AMA	NI	PRO	AMA	NI	PRO	AMA	PRO	AMA
Baço	PB	Hiperplasia	-	++	-	+	+	-	-	+	+	+	++	-	-	+	+	-	+	++	++	+		
		Hipoplasia	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PV	Nódulos	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-		
		IM	-	++	+++	+	++	+	+	+++	++	+	+++	+++	+	++	++	+	+	++	++	+++		
	EP	Nódulos	-	++	++	-	++	-	+++	++	-	+++	+++	+	+++	-	++	++	-	+	+++	++	+++	
		IM	+	++	++	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	++	++	+	+	+	+++	++	+++	
Fígado	PA	Nódulos	+	+	++	+	+++	++	+	++	++	+	++	+++	+	+	++	+	+	+	++	++	+++	
		IM	+	++	++	+	++	+	+	++	+	++	++	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+++	
Rim	IM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	++	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+			
Pulmão	IM	IM	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	+	+	-	++	-	-	+	-	++		
		Nódulos	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+		
Coração	IM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			

NOTA: CTL: grupo controle; NT: grupo não tratado; PRO: grupos infectados com formas promastigotas; AMA: grupos infectados com formas amastigotas; NI: grupos não infectados; PB: polpa branca esplênica; PV: polpa vermelha esplênica; IM: infiltrado inflamatório mononuclear; EP: espaço porta hepático; PA: parênquima hepático. - ausência; + leve; ++ moderado; +++ intenso

6.3.4 Ensaios de toxicidade

6.3.4.1 Ensaios bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas em todos os grupos experimentais, sendo que para valores com diferença estatística significativa acima dos obtidos para o grupo controle foram considerados alterados, sugerindo algum tipo de dano tecidual.

6.3.4.1.1 Provas de função hepática

Para avaliação da função hepática, verificando possível comprometimento dos animais foram realizadas as dosagens de ALT, AST, FA e GGT. Os resultados estão demonstrados nas figuras de 27 a 30.

Nas dosagens séricas de ALT, não houve diferença entre os grupos de tratamento em comparação ao grupo controle.

Nas dosagens de AST não houve diferença estatística significativa em nenhum dos grupos experimentais em comparação ao grupo controle.

Para as dosagens de FA apenas o grupo infectado com promastigotas e tratado com Glucantime[®] apresentou maior produção de FA em comparação ao grupo controle. Os demais grupos não apresentaram diferenças.

Nas dosagens de GGT não houveram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos.

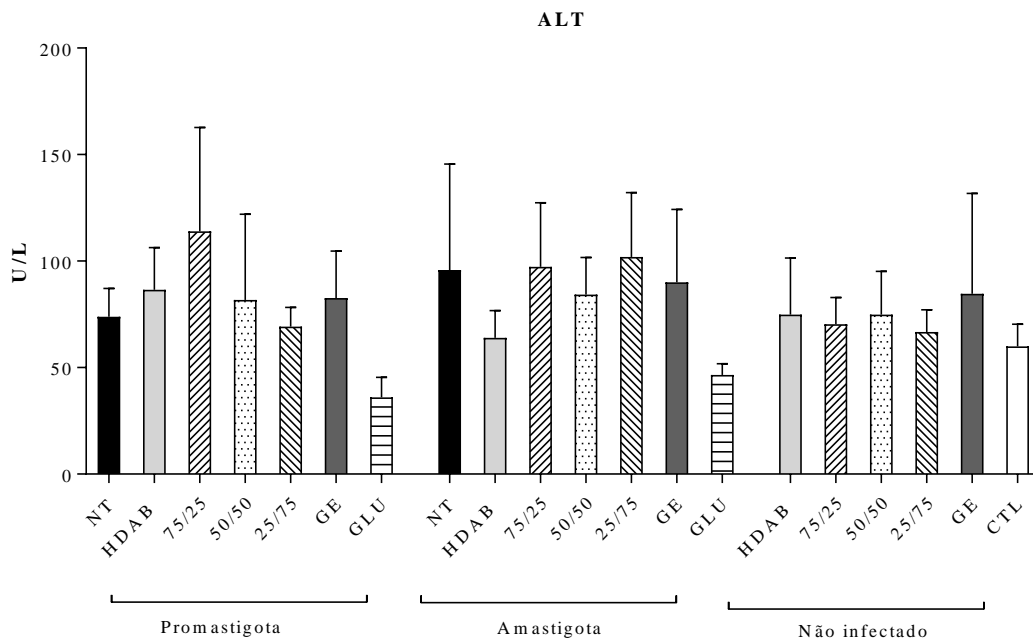


Figura 14 - Níveis séricos de ALT de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle

NOTA: $p < 0,05$ pelo teste de Mann -Whitney

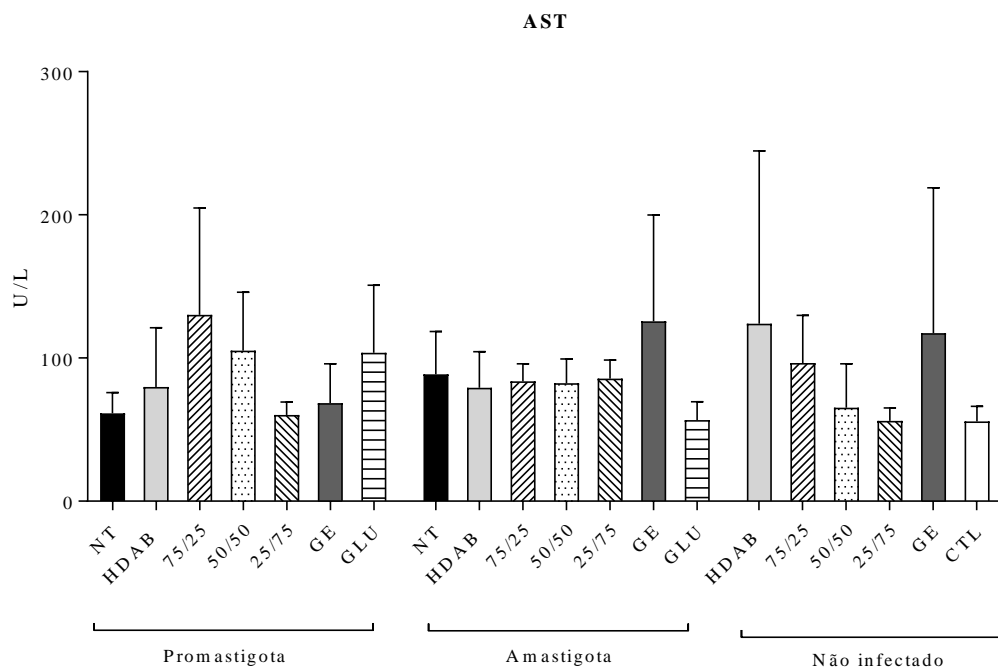


Figura 15 - Níveis séricos de AST de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle

NOTA: * $p < 0,05$ pelo teste de Mann -Whitney

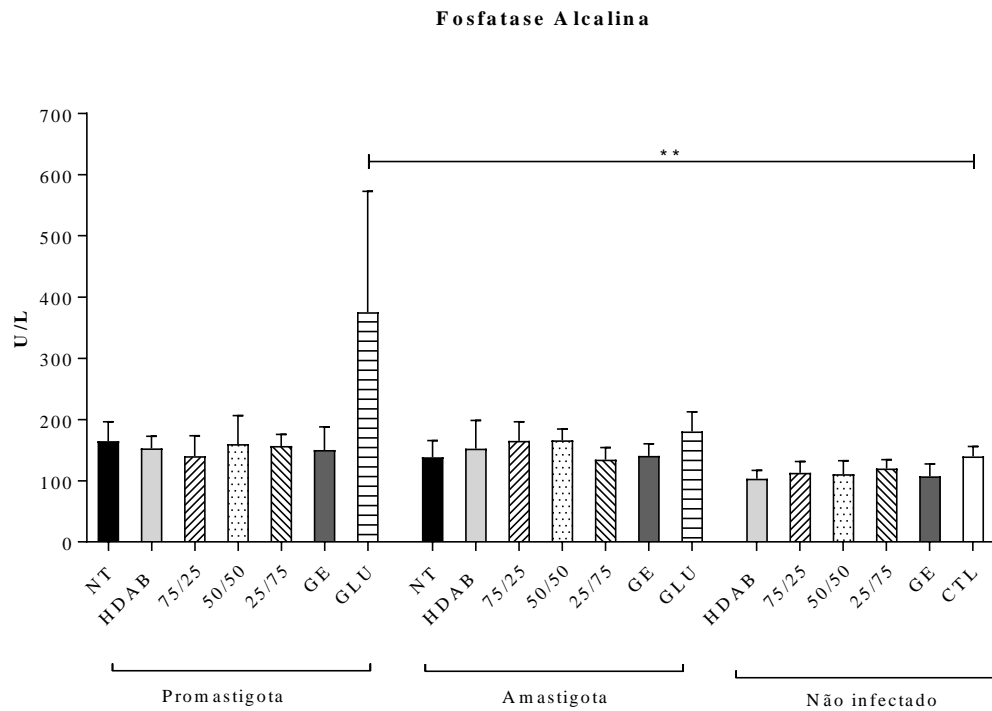


Figura 16 - Níveis séricos de AST de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle.

NOTA: ** $p < 0,01$ pelo teste de Mann-Whitney

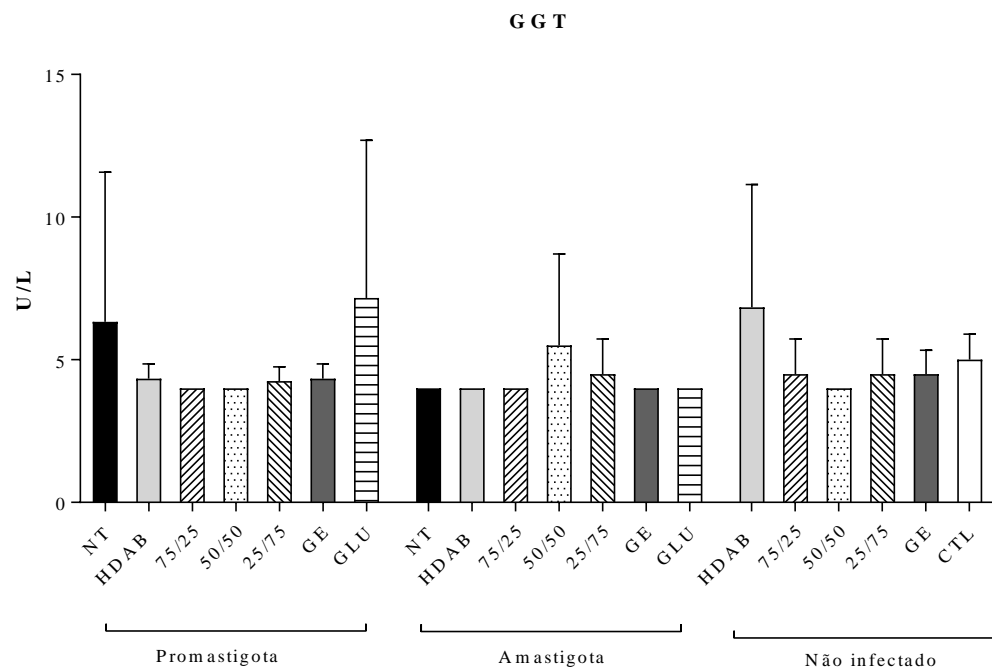


Figura 17- Níveis séricos de GGT de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle.

NOTA: * $p < 0,05$ pelo teste de Mann -Whitney

6.3.4.1.2 Provas de função renal

Para avaliação dos possíveis danos renais foram realizadas as dosagens séricas de ureia e creatinina. Os resultados estão demonstrados nas figuras de 31 a 32.

Tanto para as dosagens de ureia, quanto de creatinina, não apresentaram diferenças entre os grupos de tratamento em relação ao grupo controle.

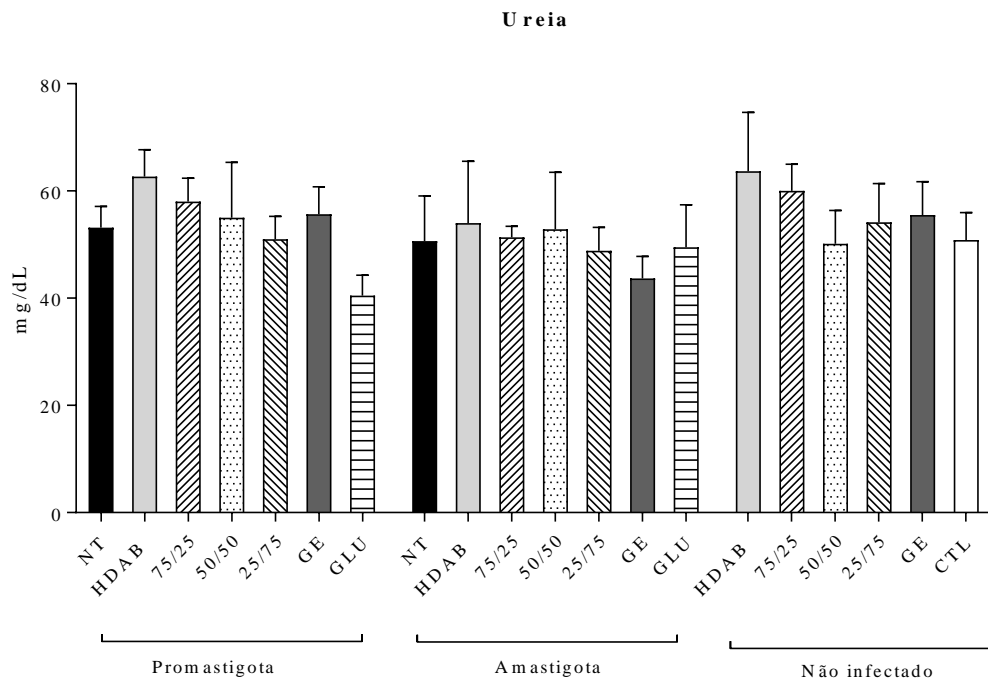


Figura 18 - Níveis séricos de Ureia de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle. Teste de Mann Whitney.

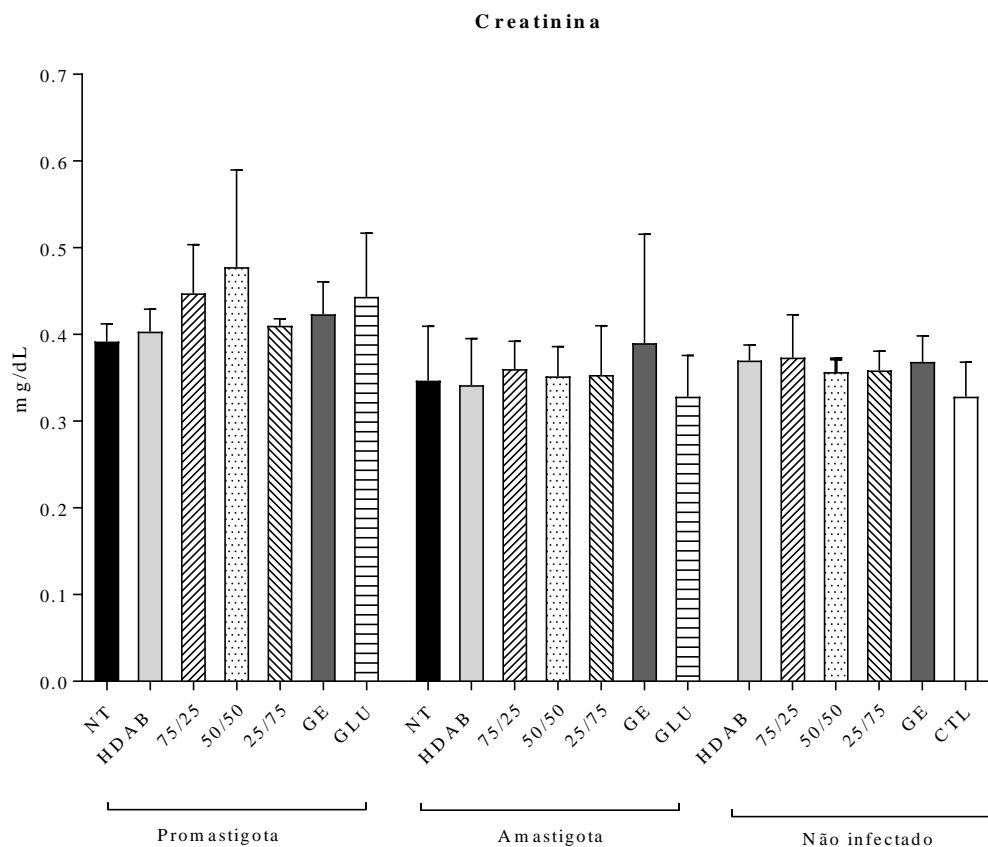


Figura 19 - Níveis séricos de Creatinina de hamsters infectados com formas promastigotas, amastigotas, não infectados e grupo controle. Teste de Mann Whitney.

6.3.4.2 Focos de criptas aberrantes

Para a identificação de focos de criptas aberrantes foram analisadas as superfícies da mucosa do intestino grosso. Nos animais do grupo tratado com DMH, foi possível identificar a presença de focos de criptas aberrantes em todos os animais, nas regiões de cólon médio e distal. Para todos os outros grupos de tratamentos não foram encontrados nenhum foco de criptas aberrantes, isso pode indicar que as substâncias testadas não foram capazes de gerar danos estruturais na mucosa intestinal na dosagem e tempo de administração utilizadas. As figuras de 33 a 39 demonstram os achados em cada grupo.

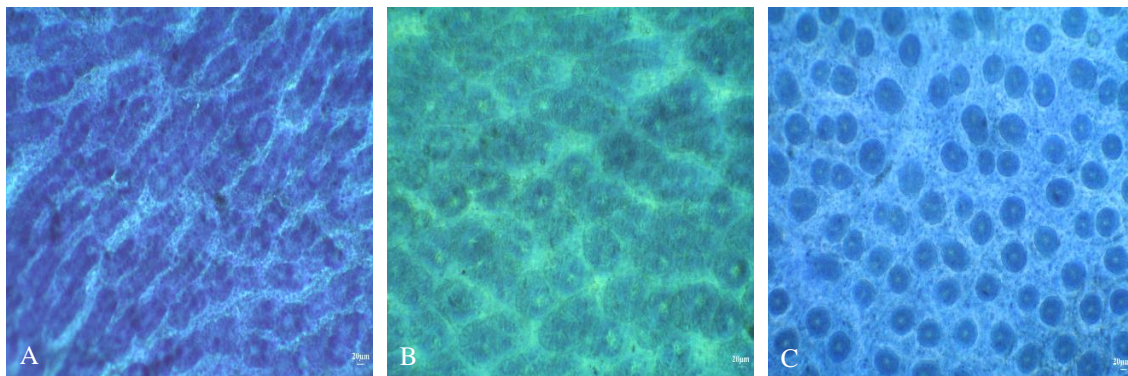


Figura 20 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters do grupo controle.

NOTA: A: cólon proximal. B: cólon médio. C: cólon distal. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

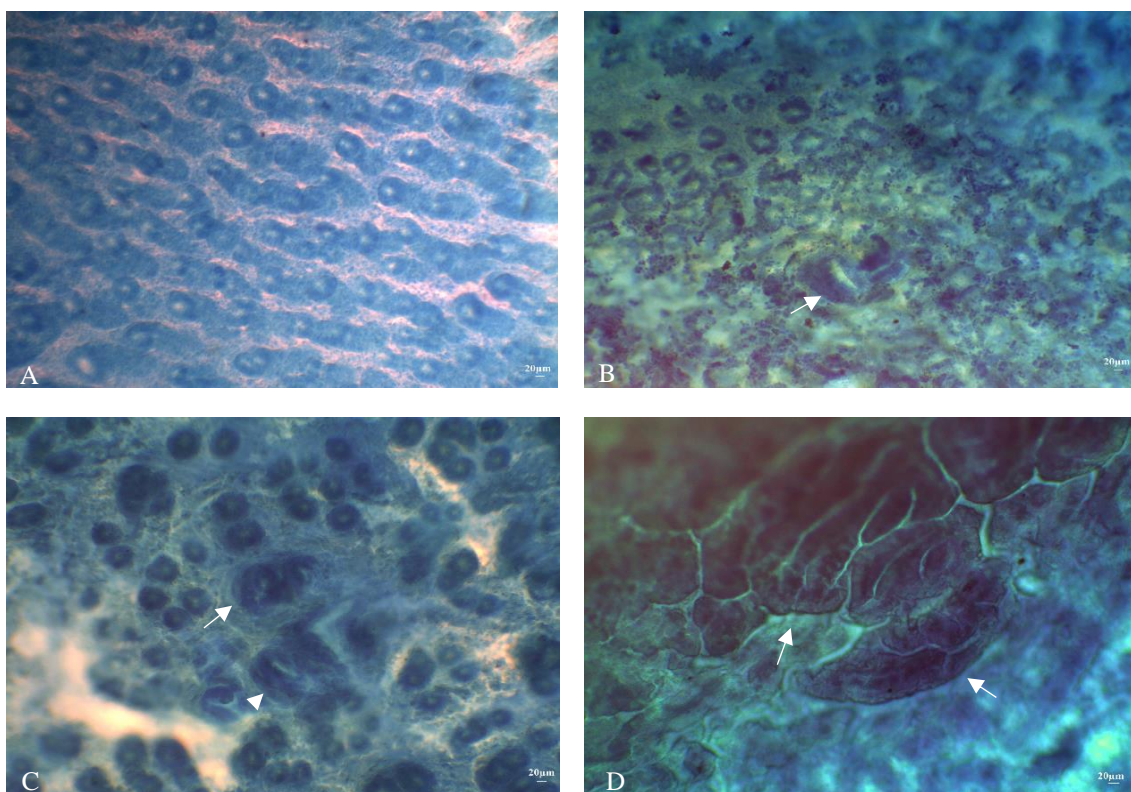


Figura 21 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com DMH.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações visíveis. B: cólon médio com foco de uma cripta aberrante (seta). C: cólon médio com presença de um foco com duas criptas aberrantes (seta) e outro foco com uma cripta (ponta de seta). D: porção distal de cólon com presença de focos com múltiplas criptas aberrantes (setas). Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

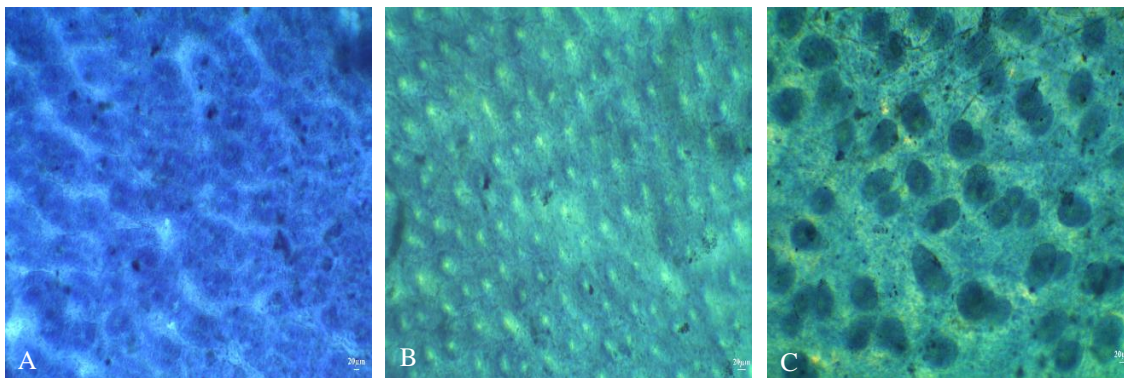


Figura 22 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com HDAB.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações. B: cólon médio sem alterações. C: cólon distal sem alterações. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

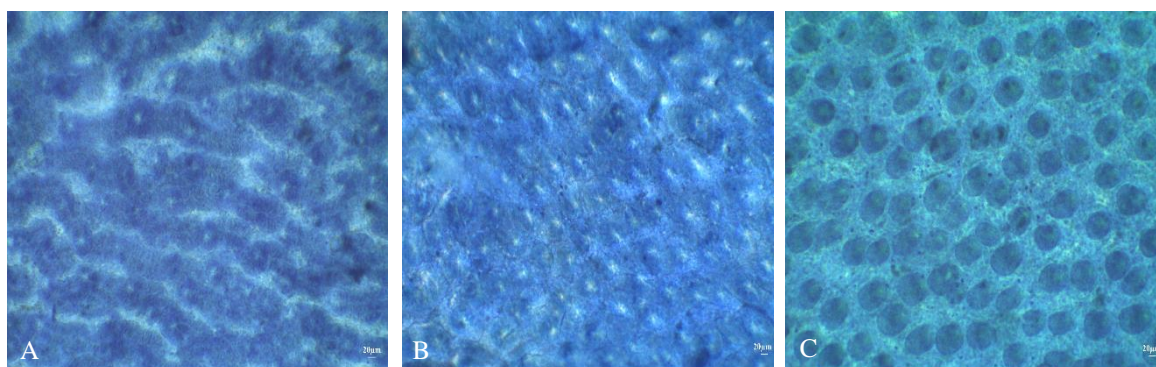


Figura 23 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 75/25.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações. B: cólon médio sem alterações. C: cólon distal sem alterações. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

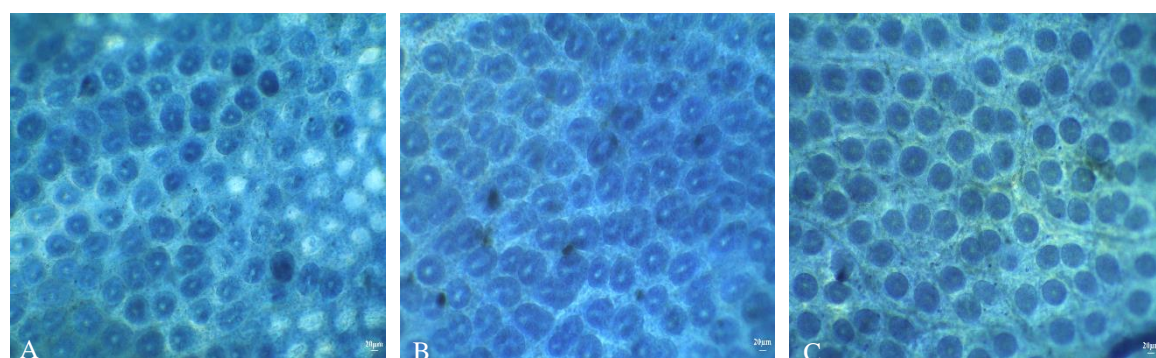


Figura 24 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 50/50.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações. B: cólon médio sem alterações. C: cólon distal sem alterações. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

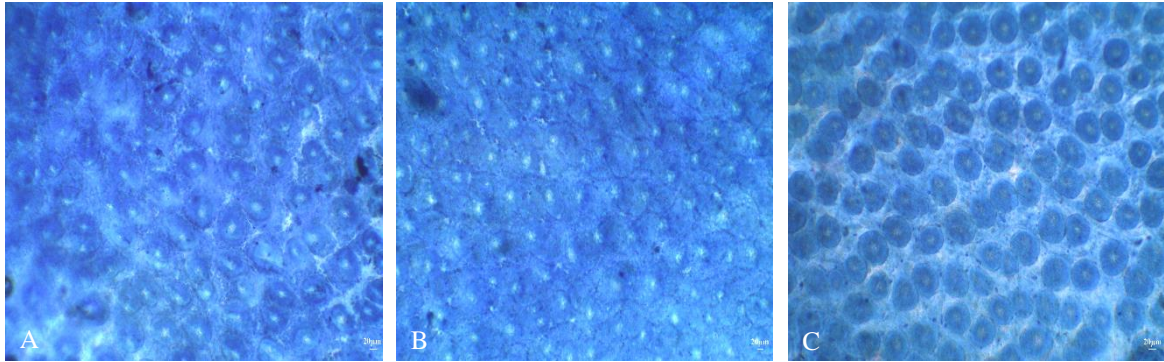


Figura 25 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com 25/75.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações. B: cólon médio sem alterações. C: cólon distal sem alterações. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

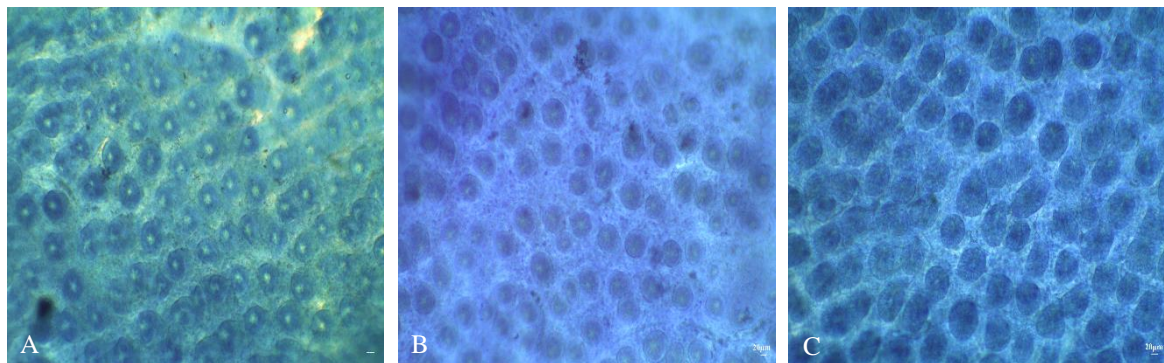


Figura 26 - Fotomicrografias de intestino grosso de hamsters não infectados, tratados com GE.

NOTA: A: cólon proximal sem alterações. B: cólon médio sem alterações. C: cólon distal sem alterações. Coloração Azul de metileno. Aumento de 100x.

6.3.4.3 Micronúcleos

Na tabela 13 estão descritos os resultados da avaliação de possível indução de danos de mutagenicidade pelos compostos por meio do aparecimento de micronúcleos em medula óssea. Os resultados demonstram que apenas o grupo tratado com doxorrubicina apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 13 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em medula óssea de hamsters

Tratamento	n	PCEs analisados	PCEMNs	%	Média ± DP
Doxorrubicina	5	10.000	205	2,05	41*** ± 15,48
HDAB	6	12.000	13	0,11	3 ± 2,29
75/25	6	12.000	21	0,17	4 ± 1,16
50/50	6	12.000	27	0,22	5 ± 1,74
25/75	6	12.000	11	0,09	2 ± 2,01
GE	6	12.000	33	0,27	7 ± 1,01
Controle	5	10.000	2	0,02	0 ± 0,55

NOTA: PCEs: eritrócitos policromáticos; PCEMNs: eritrócitos policromáticos micronucleados.
 ***p<0,001 Teste ANOVA.

7 DISCUSSÃO

7.1 *In vitro*

Nesse estudo foi possível observar a atividade dos compostos contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, sendo que na forma amastigota intracelular, um menor valor de CE_{50} das substâncias testadas. Apesar de a maioria dos estudos de triagem serem realizados em formas promastigotas, devido à facilidade na manutenção e manipulação das culturas, não é considerada a forma mais adequada, por estar presente somente no inseto vetor (DE MUYLDER et al., 2011). Por esse motivo, testes desenvolvidos em formas amastigotas, representam estudos mais específicos e relevantes na triagem de novos compostos, por se tratar da forma natural do parasito no hospedeiro vertebrado (SERENO et al., 2007).

Outro fator a ser considerado é que em experimentos em culturas de promastigotas e amastigotas axênicas a ausência da célula hospedeira, envolvendo a biologia e interações parasito-hospedeiro, podem não representar a resposta das substâncias na presença de metabolismo, que ocorre apenas em organismos vertebrados (DE MUYLDER et al., 2011). Uma tentativa para melhorar a resposta a essas possíveis interações em estudos de triagem, é a utilização de amastigotas intracelulares, que possuem diferenças em relação as amastigotas axênicas por possuírem alguns processos celulares de metabolismo, de transporte intracelular, alterações de estresse oxidativo, entre outros tipos de processos celulares ainda não totalmente elucidados (ROCHETTE et al., 2009). Alguns autores ainda comparam a utilização de macrófagos derivados de linhagens humanas (THP-1) e macrófagos derivados de medula óssea, indicando diferenças na resposta aos experimentos de triagem de substâncias para tratamento das leishmanioses quando se utiliza de diferentes linhagens macrofágicas (AULNER et al., 2013; LAMOTTE et al., 2019). Em nossos resultados, uma menor CE_{50} dos compostos em formas amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de hamsters, comparado aos resultados em culturas de promastigotas, nos indicaram uma possível alteração e melhora na resposta dessas substâncias na presença de células, especialmente na forma específica do parasito para os hospedeiros vertebrados.

Estudos de combinação de fármacos, para o tratamento da leishmaniose visceral, têm sido realizados nos últimos anos, na tentativa de reduzir a duração e dose total do tratamento, diminuir os efeitos tóxicos e os custos para os serviços de saúde; bem como tentar reduzir o aparecimento de casos de resistência, assim aumentar o tempo de vida terapêutica dos medicamentos (LEPROHON et al., 2015; OLLIARO, 2010; SUNDAR, 2001; VAN GRIENSVEN; BOELAERT, 2011). Além disso, a combinação poderia melhorar a eficácia do tratamento para a LV em casos complicados, como por exemplo, casos com associação ao HIV, onde a monoterapia não tem obtido bons resultados (ALVAR et al., 2008). Apesar de não serem conhecidos todos os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis para as leishmanioses, espera-se que a combinação de fármacos atue em sítios distintos ou por mecanismos diferentes, potencializando seu efeito (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; OLLIARO, 2010; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

Os resultados de CIF desse estudo classificados de acordo com Odds, indicam um tipo de interação indiferente ou aditiva, nos experimentos *in vitro* entre os compostos; o que também foi relatado em outros estudos de associações de fármacos (REBELLO et al., 2019; REIMÃO; TEMPONE, 2011; SEIFERT et al., 2011; SEIFERT; CROFT, 2006). Esses testes de combinação *in vitro* são uma metodologia prática e racional para triagem de combinações de fármacos. No entanto, eles não fornecem informações importantes, como as interações farmacocinéticas (SEIFERT et al., 2011) e farmacodinâmicas (SEIFERT; CROFT, 2006), que só podem ser avaliadas em ensaios com animais. Apesar da ação aditiva encontrada em formas promastigotas, observou-se também um aumento em toxicidade em macrófagos quando esses compostos foram associados.

7.2 Farmacocinética

A farmacocinética é o estudo dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de substâncias do organismo, que são determinados em uma curva de concentração-tempo em fluidos corporais, resultantes da administração de uma determinada dose. Essas informações são auxiliares para as análises de frequência e dosagem a ser utilizada, bem como investigação dos parâmetros de eficácia e toxicidade,

especialmente quando são associados à farmacodinâmica (DANHOF et al., 2008; MEIBOHM; DERENDORF, 1997).

Nos experimentos de farmacocinética realizados, foi possível verificar que o método desenvolvido em espectrometria de massas UPLC-MS/MS foi capaz de avaliar o perfil de biodisponibilidade, tempo de meia vida e *clearance* para os compostos HDAB e GE, quando administrados isolados e em associação. Foi possível verificar que para o HDAB, não houve diferença em relação a administração concomitante ao GE. Já para o GE, a combinação alterou seus parâmetros, indicando que o HDAB pode ter sido um agente causador das alterações, que podem ser de variados tipos. Podemos citar alterações em transportadores, diferenças de afinidade em enzimas metabolizadoras, maior afinidade e/ou bloqueio do transportador, bem como sofrer ações de enzimas metabolizadoras e/ou transportadores de efluxo, podendo ainda sofrer competição durante a excreção ou sofrer maior distribuição nos tecidos (PALLERIA et al., 2013; TORNIO et al., 2019). Todas essas suposições necessitam de estudos, para se comprovar tais mecanismos, especialmente por se tratarem de novos compostos com poucas informações disponíveis.

Os nossos achados de farmacocinética referentes ao GE isoladamente estão similares aos de GAO et al. (2010), que desenvolveram uma metodologia para avaliação do perfil farmacocinético de galato de etila em plasma de ratos. Algumas diferenças em relação à concentração encontrada no plasma e o tempo de meia vida, que podem estar relacionados à diferença no metabolismo entre hamsters e ratos. A determinação simultânea de substâncias por UPLC-MS/MS é uma metodologia recente e com poucos estudos, especialmente em novas substâncias, como é o caso de nossos experimentos. Alguns estudos com fármacos para hipertensão com detecção simultânea foram realizados, mas não foram observadas alteração nos perfis de biodisponibilidade das substâncias associadas e isoladas, apenas foi descrito que não houve interferência entre os fármacos (PATEL et al., 2017). Assim são necessários mais estudos para que se elucidar as modificações nos perfis farmacocinéticos em associação.

7.3 Carga parasitária

Em relação à avaliação da carga parasitária nos animais foi utilizada a metodologia de quantificação por qPCR. Esse tipo de análise vem sendo utilizada em

alguns estudos de teste de fármacos e compostos leishmanicidas (COLOMBO et al., 2017; GUPTA et al., 2012; REIMÃO et al., 2012), na avaliação e monitoração da carga parasitária em diversas amostras e tecidos por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade (MANNA et al., 2004; QUARESMA et al., 2009; VERGEL; WALKER; SARAVIA, 2005).

A qPCR apresenta vantagens em relação à quantificação de amastigotas por LDU, descrito por Stauber (1958), aonde as quantificações são realizadas em impressões de órgãos em lâminas, corados por Giemsa, e são realizadas as contagens do número de amastigotas em relação ao número de macrófagos. Esse método pode apresentar baixa sensibilidade, devido a uma distribuição não uniforme dos parasitos no tecido, e conseqüentemente ao longo da lâmina e também necessitar de pessoa treinada para avaliação (BRETAGNE et al., 2001). Outra opção é diluição limitante em meio de cultura (BUFFET et al., 1995), mas os ensaios são laboriosos e podem ser limitados por contaminação microbiana (BRETAGNE et al., 2001).

Em nossos ensaios foi possível realizar a quantificação da carga parasitária em todos os grupos experimentais. Para os grupos infectados com promastigotas, apenas o grupo tratado com Glucantime[®] apresentou uma redução significativa na carga parasitária tanto no baço e no fígado em relação ao grupo não tratado. Já nos grupos infectados com amastigotas, a redução significativa se deu na combinação de 75% HDAB e 25% GE tanto no baço, quanto no fígado, e o grupo Glucantime[®] apresentou redução significativa da carga parasitária apenas no baço. Dessa forma observou-se uma variação da resposta entre os tratamentos, inclusive para o tratamento padrão com Glucantime[®]. Esse fato pode se relacionar à uma variação na resposta de hamsters à infecção (DEA-AYUELA et al., 2007; REQUENA et al., 2000), especialmente à forma infectante, pois já foi relatado a diferença entre infecção com promastigotas e amastigotas, em relação ao aparecimento dos sinais clínicos e distribuição do parasito nos órgãos alvo (RIÇA-CAPELA et al., 2003). Contudo, são necessários mais estudos nesse modelo animal, visto que se tratam de animais heterogêneos e com variações em seus perfis de resposta.

7.4 Resposta imune

Em nosso estudo foi avaliada a expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , IL-17 e TNF α e anti-inflamatórias IL-10; IL-4, TGF β no baço e

fígado de hamsters por meio de ensaios de PCR em Tempo Real. Os fatores que determinam a resistência ou susceptibilidade à infecção na LV ainda não estão totalmente estabelecidos, mas sabe-se que a resposta imune está intimamente ligada à evolução da doença (BUCHETON et al., 2002; DAS; ALI, 2012; KHADEM; UZONNA, 2014; KUMAR; NYLÉN, 2012; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005).

Diversos estudos indicam que TNF_{α} e $IFN-\gamma$ desempenham importante papel em limitar a progressão da doença, por serem os principais ativadores de macrófagos a produzirem espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo superóxido, H_2O_2 , radicais hidroxila e óxido nítrico, que são mecanismos efetores no controle da replicação e morte do parasito (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; DAS; ALI, 2012; GOTO; LINDOSO, 2004; KHADEM; UZONNA, 2014; KIMA; SOONG, 2013; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Além disso, $IFN-\gamma$ induz a diferenciação de células T auxiliares indiferenciadas para células Th1. Essa polarização para uma resposta Th1, envolve macrófagos do subtipo M1, que induzem a uma resposta inflamatória aguda com a produção de citocinas como IL- 1β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, $TNF-\alpha$, e várias quimiocinas que levam a uma maior ativação do perfil Th1, que facilitam a fagocitose mediada por complemento, e são responsáveis pela fagocitose e morte de microrganismos intracelulares precocemente (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Alguns autores relatam que hamster infectados com *L. donovani* apresentam naturalmente uma maior expressão de perfil de resposta do tipo Th1, especialmente de $IFN-\gamma$ e IL-2, contudo, esses animais possuem uma falha na produção NO via NOS_2 que são fatores essenciais para o controle de microrganismos intracelulares (KONG et al., 2017; MELBY et al., 2001).

A citocina IL-17 tem sido estudada por alguns autores como uma citocina indutora de resposta pró-inflamatória, com aumento da expressão de citocinas e quimiocinas que favorecem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (GHOSH et al., 2013; PITTA et al., 2009). No entanto, para que haja a expressão dessa citocina é necessário um perfil de resposta do tipo Th17, em que se necessita de um ambiente com presença de IL-6, IL-12, e IL-23, $TGF-\beta$, IL-21, IL- 1β , nota-se ainda que IL-23 e IL-1 possuem uma grande participação em ativação de células de memória Th17 (MILLS, 2008). Algumas dessas citocinas são produzidas tanto em humanos quanto em modelos murinos por células dendríticas e macrófagos em resposta a sinais endógenos e exógenos, sendo considerada uma boa resposta especialmente em infecções intracelulares. Porém em casos de

exacerbação da resposta inflamatória pode ser prejudicial ao organismo, devido ao intenso dano tecidual (KUMAR; NYLÉN, 2012), sendo citada como responsável pela disseminação da LV em alguns casos de infecções por *L. donovani* (BANERJEE et al., 2016; TERRAZAS et al., 2016).

Em nossos experimentos todos os animais dos grupos infectados com promastigotas tiveram uma maior expressão de IFN- γ no baço em relação aos animais do grupo não tratado, inclusive os animais do grupo controle apresentaram maior expressão, indicando que para o grupo que não recebeu tratamento a infecção induziu uma supressão da expressão de IFN- γ . Assim, podemos sugerir que os tratamentos nessa forma de infecção (promastigotas) foram capazes de estimular o sistema imune a manter a expressão de IFN- γ que já estava presente no grupo não infectado, mesmo tendo em vista que esses tratamentos não foram satisfatórios para redução significativa da carga parasitária, o que pode estar relacionado a falha nos mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio (KONG et al., 2017; MELBY et al., 2001). Essa maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, especialmente de IFN- γ nos grupos tratados encontrou-se semelhante aos achados de Gupta com hamsters infectados com *Leishmania donovani* e tratados com miltefosina (GUPTA et al., 2012), que encontrou o aumento na resposta imune Th1, sugerindo uma possível indução de melhora da resposta. Nos fígados dos animais, o perfil de expressão de IFN- γ apresentou maior expressão apenas no grupo CTL, sendo necessários outros estudos para avaliar os mecanismos de uma menor expressão em animais infectados e a importância desse perfil de resposta nesse órgão.

Sobre a expressão de TNF- α , em infecção por promastigotas no baço, apenas o grupo HDAB apresentou maior expressão do que os grupos NT e CTL, contudo em amastigotas esse grupo de tratamento apresentou uma redução da expressão em comparação aos grupos NT e CTL. Como nenhum desses grupos de tratamento com HDAB foi significativo na redução da carga parasitária, pode-se tratar de um processo inflamatório intenso, estimulado via ativação do perfil Th1, no entanto, não satisfatório na eliminação do parasito. No fígado observou-se apenas menor expressão do HDAB comparado ao CTL e NT, que da mesma forma como descrito anteriormente, necessitamos de mais estudos para elucidar tais perfis.

Em relação à expressão de IL-17 no baço dos animais infectados com promastigotas, todos os grupos apresentaram um aumento da expressão em comparação ao grupo CTL, inclusive o grupo NT, sendo que apenas o grupo Glucantime[®] apresentou

redução significativa da carga parasitária. Já para os grupos infectados com amastigotas a resposta foi mais variável, com alguns grupos expressando mais que NT (Glucantime[®]), outros com maior expressão que o CTL (NT e 25/75) e alguns com menor expressão que o CTL (HDAB e 50/50), contudo apenas um grupo (75/25) apresentou uma redução da carga parasitária, e esse grupo não apresentou diferença significativa na expressão de IL-17. No fígado dos animais infectados com promastigotas, alguns grupos tratados mostraram maior expressão (75/25 e GE) quando comparados ao NT e CTL, podendo indicar que esses compostos levaram a estimulação da expressão nesses grupos, o que pode se tratar de uma característica de resposta local do fígado. Já em amastigotas, encontrou-se a redução de IL-17 no grupo 75/25 e 25/75, ressaltando que o grupo 75/25 foi o único com redução significativa da carga parasitária, indicando mais uma vez a diferença na resposta entre infecções. Um estudo utilizando camundongos C57BL/6 infectados com formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, bem como a utilização de soro de pacientes infectados com o mesmo parasito, indicam que IL-17 age sinergicamente com IFN- γ na resistência a infecção em *Leishmania*, por meio do aumento da expressão de NO pelos macrófagos e consequente morte do parasito, ressaltam ainda que essa interleucina está presente no pico do parasitismo e tende a reduzir a sua produção após o término do tratamento (NASCIMENTO et al., 2015). Como apenas alguns grupos em nossos experimentos tiveram a redução na carga parasitária, sem apresentarem a expressão elevada de IL-17, podemos supor que se trata do início da remissão do processo inflamatório. Porém são necessários mais estudos para justificar essa hipótese, especialmente por se tratar de outro modelo animal e por estarmos utilizando diferentes formas do parasito para a infecção.

Em outro polo de resposta, existe o perfil de linfócitos do tipo Th2, com a produção de citocinas como IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , dentre outras, que apresentam um fenótipo anti-inflamatório ou imunorregulador, com presença de macrófagos do tipo M2, especialmente por ativação da enzima arginase, favorecendo a sobrevivência de *Leishmanias* intramacrofágicas e consequentemente a progressão da doença (MUXEL et al., 2018; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Foi descrito que a IL-10 tem papel na modulação da resposta imune, mantendo a homeostase e prevenindo danos teciduais, especialmente após o término do estímulo inflamatório. Porém, se tratando de infecções por protozoários, essa modulação leva a uma supressão de uma resposta efetora à infecção, através da supressão da atividade

macrofágica (BACELLAR et al., 2000; MELBY et al., 2001). Alguns autores indicam que alterações relacionadas à inibição de receptores de células T, bem como expressão de citocinas regulatórias como IL-10 e IL-21 em hamsters cronicamente infectados com *L. donovani*, mesmo quando esses apresentam uma produção efetiva de IFN- γ e TNF- α , seus macrófagos se tornam não responsivos a ativação e se tornam incapazes de controlar a infecção (MEDINA-COLORADO et al., 2017)

Sobre a IL-4, sua maior expressão se relaciona à susceptibilidade, e comumente está presente no pico do parasitismo (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012), bem como é capaz de inibir a ativação macrofágica (MIRALLES et al., 1994) ou facilitar a entrada do parasito em macrófagos, contudo ainda não está totalmente elucidado o mecanismo de progressão do parasitismo em LV humana (OSORIO et al., 2014). Alguns relatos de que quando ocorre elevação dos níveis de IL-4 no baço, há o aumento do parasitismo, bem como expressão de alguns fatores de crescimento com consequente aumento da expressão de arginase 1, que vem sendo estudada como um potencial alvo para tratamentos, que juntamente com os receptores de fatores de crescimento, estão diretamente relacionados ao direcionamento para o perfil de resposta Th2, produção de macrófagos M2 e progressão da LV (DALTON et al., 2010; OSORIO et al., 2014).

A citocina TGF- β está relacionado à progressão e susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, por inibir a produção de IFN- γ em células CD4+ juntamente com IL-10 (SAHA et al., 2007; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Quando presente, essa citocina prolonga a sobrevivência do parasito, por evitar sua destruição pelos macrófagos (BARRAL-NETTO et al., 1992), especialmente em baixos níveis de IL-12 (WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). Existem relatos na Índia, de que a persistência residual de IL-10 e TGF- β em pacientes tratados e curados da forma visceral da doença, levam a uma maior predisposição a desenvolverem leishmaniose dérmica pós calazar, especialmente em tratamentos à base de antimoniais, com indícios que essas duas citocinas tenham um papel na reativação da infecção, sugerindo que essa forma se relacione ao quadro de imunossupressão (SAHA et al., 2007).

Em nossos resultados observamos no baço uma maior expressão de IL-10 nos grupos tratados com HDAB em formas promastigotas comparado ao grupo CTL, e uma maior expressão para os grupos HDAB, 25/75 e GE infectados com amastigotas comparados ao grupo NT. No fígado observa-se que todos os grupos infectados apresentam maior expressão do que o grupo CTL, contudo sem diferenças entre os

infectados, tanto em promastigotas e amastigotas. Nessas condições pode-se inferir que apesar de alguns grupos, especialmente de infectados com promastigotas terem apresentado alta expressão de IFN- γ , na presença de maior produção de IL-10, ocorre a falha na ativação de macrófagos, com conseqüente deficiência em mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio efetoras no controle da LV (CALDAS et al., 2005; MEDINA-COLORADO et al., 2017).

Para as análises de IL-4, os perfis de expressão se encontraram muito semelhantes entre baço e fígado de infecção com promastigotas, e entre esses e o fígado de amastigotas. No baço dos animais infectados com formas amastigotas, alguns apresentaram redução de expressão (HDAB e 75/25), sendo que o grupo 75/25 foi o único a apresentar redução significativa da carga parasitária; outros grupos demonstraram aumento da expressão (25/75, GE e Glucantime[®]). Como ainda não está totalmente comprovado o mecanismo de ação de IL-4 na LV, podemos sugerir que outros fatores imunes estão contribuindo para essas diferenças de padrões de expressão de IL-4 (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012).

Finalmente para a expressão de TGF- β no baço, em hamsters infectados com promastigotas, apenas o grupo Glucantime[®] apresentou redução na expressão, sendo que foi o único grupo com redução da carga parasitária, o que pode estar relacionado a uma diminuição desse perfil após redução do estímulo antigênico. Para os grupos de infecção com amastigotas, alguns tiveram maior expressão (50/50, 25/75 e GE) e outros menor expressão (HDAB), contudo nenhum desses grupos apresentaram redução da carga parasitária, assim pode-se apenas correlacionar ao quadro de imunossupressão com progressão da doença. Em fígado, todos os grupos apresentaram maiores expressões do que o grupo CTL, e o grupo Glucantime[®] novamente apresentou uma redução de sua expressão comparado ao NT. Foi descrito que TGF- β tem capacidade de inibir a produção de IFN- γ por células CD4+ em granulomas hepáticos em modelo de camundongos BALB-c infectados com *L. chagasi*, e é capaz de diminuir efetivamente a ativação do perfil Th1, associado especialmente com IL-10 e IL4 (WILSON et al., 1998). Os mesmos autores descrevem a importância da redução de expressão de TGF- β para que se possa desenvolver imunidade adequada, quando testado após imunização.

Essa diferença no perfil de expressão de citocinas entre os tratamentos, pode se relacionar à diferentes formas do parasito utilizado para as infecções, pois alguns autores já relataram algumas diferenças como o tempo de evolução da doença utilizando formas

promastigotas e amastigotas, diferenças na produção de anticorpos (RIÇA-CAPELA et al., 2003), contudo são necessários mais estudos para comprovar essas diferenças. Podemos sugerir que em nossos modelos de tratamento, utilizando a metodologia de expressões de mRNA por PCR em tempo real, os resultados de quantificações de citocinas responderam de forma diferente em cada infecção e também a expressão se dá de forma diferente no baço e fígado, provavelmente devido ao tipo celular e arquitetura morfológica de cada órgão, em geral mais exacerbada no fígado como por exemplo, a formação de granulomas.

7.5 Histopatológico

A LV consiste no desenvolvimento de uma resposta imune órgão específica, sendo que baço, fígado e medula óssea são os principais alvos atingidos (ROUSSEAU et al., 2001). Sugere-se que a persistência e multiplicação dos parasitos no baço esteja relacionado à uma falha na formação de granulomas, esplenomegalia persistente, desorganização da polpa branca e hipertrofia da polpa vermelha, sendo esses últimos relacionados à presença de TNF- α , além de atividade hematopoética aumentada (KAYE et al., 2004).

Em nossos experimentos foi possível observar que as principais alterações no baço foram a presença de hiperplasia de folículos linfoides da polpa branca, que variou de intensidade por grupo, ocorrendo de forma mais pronunciada em infecções com formas promastigotas. Em alguns dos grupos de tratamento, observou-se uma redução do processo inflamatório comparado ao grupo não tratado (grupos 75/25, 50/50 e Glucantime[®] em promastigotas e 75/25 e 25/75 em amastigotas). Na fase inicial da doença, a polpa branca apresenta hiperplasia linfoide reacional com aumento do número de macrófagos (CORBETT et al., 1992; DOS-SANTOS et al., 2014; HERMIDA et al., 2018), com a evolução e cronicidade transforma-se em hipoplasia de folículos linfoides, associado a necrose, fibrose com destruição da arquitetura da polpa branca (HERMIDA et al., 2018; KAYE et al., 2004), sendo que quanto mais crônica a evolução, pode levar a atrofia desses folículos com a destruição da polpa branca. Essa alteração pode estar associada ao acúmulo de plasmócitos no baço, como consequência da diminuição severa de proteínas plasmáticas e aumento de globulinas, eritrofagocitose, depleção de células B e T, com a substituição da polpa branca por plasmócitos, que são células especializadas

em produção de anticorpos derivados de linfócitos B, contudo esse mecanismo de substituição não está completamente elucidado (SANTANA et al., 2008; SILVA-O'HARE et al., 2016; VERESS et al., 1977). Alguns estudos em cães indicam que a presença de hiperplasia em polpa branca tem uma correlação com um melhor controle ou resistência a doença do que a hipoplasia, pois nessa região ocorre boa parte da resposta imune efetora (HERMIDA et al., 2018; SANTANA et al., 2008). Nosso estudo foi realizado em animais com infecções de 60 dias, com o término aos 75 dias de infecção. Os achados de hiperplasia em polpa branca diferem de estudo realizado por Almeida (DE ALMEIDA et al., 2017) que os animais apresentaram hipoplasia da polpa branca, contudo nesse experimento os animais foram infectados com 10^8 parasitos e o fim do experimento ocorreu aos 90 dias de infecção.

Para as análises em polpa vermelha, predominou em nossos experimentos o infiltrado de células mononucleares, especialmente de macrófagos formando nódulos, sendo que na infecção por amastigotas foi observado intenso parasitismo. Com a evolução do parasitismo, a polpa vermelha acumula plasmócitos e há exacerbação do processo inflamatório que constitui-se principalmente de macrófagos, podendo ainda ser encontrado linfócitos, granulócitos, megacariócitos e substância amiloide (DOS-SANTOS et al., 2014; HERMIDA et al., 2018; RIÇA-CAPELA et al., 2003; SANTANA et al., 2008). Alguns de nossos grupos apresentaram redução do infiltrado inflamatório em promastigotas (grupo Glucantime[®]), e em amastigotas, redução do processo inflamatório e de formação de nódulos (grupos 75/25, 50/50, GE e Glucantime[®]), sendo que o grupo 75/25 essa redução foi mais pronunciada, podendo indicar que o tratamento nesse grupo foi mais satisfatório, pois além da melhor preservação dos tecidos esplênicos, observou-se a redução significativa na carga parasitária.

Sobre as alterações no fígado, em geral ocorre a formação de granulomas em torno de células de Kupffer e macrófagos infectados (STANLEY; ENGWERDA, 2007; VIANNA; TAKIYA; DE BRITO-GITIRANA, 2002), podendo se encontrar junto aos granulomas, células epitelioides, células multinucleadas e células gigantes contendo corpos de Schaumann, e deposição secundária de substância amiloide (DE ALMEIDA et al., 2017; LAURENTI et al., 1990; RIÇA-CAPELA et al., 2003). O infiltrado inflamatório pode ocorrer no espaço porta, especialmente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos; na região intralobular, com presença de hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, infiltrado inflamatório mononuclear em sinusoides hepáticos, presença de

parasitos (DE ALMEIDA et al., 2017; EL HAG et al., 1994; LAURENTI et al., 1990; VIANNA; TAKIYA; DE BRITO-GITIRANA, 2002), podendo ainda ser encontrado infiltrado inflamatório e necrose em veias centrolobulares (EL HAG et al., 1994).

O padrão de resposta inflamatória em nossos experimentos, especialmente nos grupos não tratados se deu por infiltrado mononuclear e formação de nódulos no espaço porta, e no parênquima hepático infiltrado inflamatório com intensa formação de nódulos, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, bem como necrose hepatocelular. Nos grupos de tratamento foi possível observar uma redução no infiltrado inflamatório no espaço porta em infecções por promastigotas (grupo Glucantime[®]) e amastigotas (HDAB e GE) e diminuição da formação de nódulos em promastigotas (HDAB, 75/25, GE e Glucantime[®]) e amastigotas (HDAB, 50/50, GE e Glucantime[®]). Já no parênquima hepático, redução de infiltrado inflamatório em promastigotas (HDAB e 75/25) e amastigotas (todos os grupos de tratamento), bem como diminuição da produção de nódulos em promastigotas (HDAB, 50/50, GE e Glucantime[®]) e em amastigotas (HDAB, 75/25, 50/50, GE e Glucantime[®]). Vale ressaltar que em infecções por promastigotas apenas o grupo Glucantime[®] obteve uma redução significativa na carga parasitária, com a observação de um menor processo inflamatório tanto em espaço porta, quanto em parênquima hepático. Em infecções por amastigotas o grupo Glucantime[®] manteve sua redução de carga parasitária e do processo inflamatório, contudo no grupo 75/25 que apresentou redução significativa da carga parasitária, observou-se um aumento no infiltrado inflamatório, com presença de células gigantes e nódulos no espaço porta, na região do parênquima observou-se redução do processo inflamatório. A redução do processo inflamatório em grupos de animais com tratamentos e que obtiveram redução da carga parasitária também foi relatado em outros estudos (DA SILVA et al., 2020; DE ALMEIDA et al., 2017), indicando uma melhor preservação tecidual após o tratamento.

A alteração renal em casos de leishmaniose visceral é descrita como infiltrado inflamatório importante de células mononucleares no interstício, e que ocorre em menor intensidade nas regiões tubulares (CARAVACA et al., 1991; DUARTE et al., 1983; OLIVEIRA et al., 1985; SALGADO FILHO; FERREIRA; COSTA, 2003). Sendo que de acordo com o grau de severidade das alterações encontradas no interstício, podem levar ao quadro de insuficiência renal (DUARTE et al., 1983; SALGADO FILHO; FERREIRA; COSTA, 2003), e quanto maior o comprometimento renal, maior incidência de morte (DA SILVA JUNIOR; GUARDÃO BARROS; DE FRANCESCO DAHER,

2014). São atribuídas várias causas para o comprometimento renal, desde o aumento da produção de globulinas, diminuição da albuminemia, deposição de substância amiloide, aumento da deposição de imunocomplexos, bem como a presença do próprio parasito, induzindo uma reação inflamatória intensa que pode levar a necrose tubular tanto pelo processo inflamatório, quanto por isquemia devido a obliteração de vasos e hemólise (CARAVACA et al., 1991; KUMAR; DANESHBOD; SADEGHIPOOR, 2004; OLIVEIRA et al., 1985; ROLLINO, 2003) e recentemente foi descrito um padrão de glomerulonefrite membranoproliferativa e crioglobulinemia mista com características autoimunes (hipocomplementemia, anticorpos antinucleares e antiDNA em paciente com infecção por *Leishmania* (PADRÓN ROMERO et al., 2020).

Em nossos experimentos, observamos que os animais dos grupos não tratados infectados com promastigotas apresentaram infiltrado inflamatório intersticial e agressão ao epitélio tubular, e no grupo amastigotas infiltrado inflamatório peritubular. Nos grupos de tratamentos de uma forma geral, as alterações inflamatórias em promastigotas foram no interstício sem alterações tubulares, e em amastigotas alguns grupos apresentaram leves alterações peritubulares ou nenhuma alteração (25/75, GE e Glucantime®). Destaca-se que o grupo tratado com Glucantime® não apresentou nenhum processo inflamatório em ambas infecções, indicando que o tratamento conseguiu restabelecer o padrão normal do órgão, semelhante a outros tratamentos em humanos (CARAVACA et al., 1991; EFSTRATIADIS et al., 2006), apesar de ser relatado que esse medicamento apresenta potencial nefrotóxico (CLEMENTI et al., 2011), algo que ocorre com tratamentos à base de Anfotericina B, que indicam um aumento da incidência de insuficiência renal aguda, sendo contraindicado em pacientes com alterações renais (ROCHA et al., 2010). Apesar dos nossos compostos não terem reduzido totalmente o processo inflamatório, houve uma pequena redução se comparado ao grupo NT, e nenhum dos grupos levou a exacerbação do processo inflamatório e não foram observados danos ao epitélio, o que pode sugerir uma certa preservação tecidual aos rins.

Alterações pulmonares em casos de leishmaniose visceral já foram descritas em humanos, cães e em hamsters (BISPO et al., 2020; DASGUPTA et al., 2014; DUARTE et al., 1986, 1989; EDUARDO PEREIRA CORBETT; DALASTRA LAURENTI, 1998; OLIVEIRA et al., 2012). As manifestações clínicas incluem tosse, taquipneia, dor na região torácica e em alguns casos pneumonia, que geralmente está associada a infecção bacteriana (BISPO et al., 2020). As alterações histológicas incluem infiltrado

inflamatório distribuído de forma aleatória no parenquima e no interstício, presença de espessamento de septos interalveolares devido a infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (DUARTE et al., 1989), podendo também ser devido a proliferação de células epiteliais e fibroblastos (ALVES et al., 2010). Pode ser observada congestão da parede alveolar, infiltrados inflamatórios peribrônquicos e peribronquiolares compostos por células mononucleares com invasão da membrana basal e lâmina própria (ALVES et al., 2010).

Em nossos experimentos observamos alterações pulmonares apenas nos grupos infectados com formas amastigotas, sendo que a maioria das alterações encontradas foram infiltrado inflamatório mononuclear em septo alveolar que variou de leve a moderada intensidade, e um grupo (50/50) apresentou infiltrado inflamatório peribronquico, Esses achados estão semelhantes a Duarte (1984), que encontraram alterações em septos alveolares, sendo que alguns animais apresentaram focos de pneumonia intersticial, no entanto, outras alterações podem se relacionar a um período superior de acompanhamento da infecção. Assim, ressaltamos que o hamster por ser um modelo susceptível à infecção, mimetiza as alterações que são encontradas em humanos (DUARTE; CORBETT, 1984), sendo que as alterações pulmonares são descritas como uma forma de facilitar infecções bacterianas secundárias, o que piora o quadro e prognóstico da leishmaniose (DUARTE et al., 1989), além do que o processo inflamatório local pode levar a complicações, como o caso descrito de desenvolvimento de efusão pleural em paciente com infecção por *Leishmania donovani* (DASGUPTA et al., 2014). Por fim, mais uma vez observamos diferença na resposta dos animais entre as diferentes formas de infecção, sendo encontrada apenas nos grupos infectados com formas amastigotas.

7.6 Ensaio bioquímico

Ensaio bioquímico são realizados para avaliação do funcionamento de órgãos, por meio de quantificação de enzimas presentes no soro. Quando encontram-se elevadas, as enzimas indicam lesão ou dano ao local onde são sintetizadas ou excretadas (WASHINGTON; VAN HOOSIER, 2012).

Variações nos valores bioquímicos podem alterar em função da idade, sexo, dieta, temperatura, além da excitação proveniente da contenção do animal antes da coleta de sangue (THRALL et al., 2015). O hamster dourado ainda possui algumas limitações na

utilização como modelo animal devido à pouca informação disponível a respeito de seus valores de referências de dados hematológicos, bioquímicos, entre outros aspectos biológicos. Dessa forma optamos por comparar os dados dos animais infectados e não infectados com os dados dos animais do grupo controle.

Em nosso estudo realizamos a quantificação de enzimas hepáticas ALT, AST, FA e GGT. Os níveis circulantes dessas enzimas são marcadores de lesão hepática, associada à integridade celular ou a condições ligadas ao trato biliar, podendo ser usado para determinar a gravidade da inflamação, lesão ou obstrução hepática (KUNUTSOR, 2016).

A alanina aminotransferase (ALT) catalisa a transferência de um grupo amino para formar o piruvato e o glutamato. É encontrada no soro e em outros tecidos, especialmente no fígado, podendo ser encontrada nos rins, músculo esquelético e miocárdio. Encontra-se elevada no soro sob condições de necrose celular, em casos de hepatite, insuficiência cardíaca congestiva, lesão do fígado ou ducto biliar e miopatias (EVANS, 2009).

Aspartato aminotransferase (AST) catalisa a conversão de aspartato e alfa-cetoglutarato em oxaloacetato e glutamato. Está presente em todos os tecidos, exceto nos ossos, com níveis mais elevados no fígado e no músculo esquelético. A concentração se eleva após hematoma, trauma, necrose, infecção ou neoplasia hepática (EUGSTER; ALBERT; KALTER, 1966). Pode ser encontrada no líquido cefalorraquidiano, exsudatos e transudatos em proporção à quantidade de dano celular (EVANS, 2009).

A fosfatase alcalina (FA) representa um grupo de enzimas que removem grupos fosfato de moléculas, como nucleotídeos e proteínas. São encontradas no fígado e ossos, e em menor proporção nos túbulos renais, epitélio intestinal, pulmão e placenta. A concentração varia de acordo com a espécie, mas em geral é aumentada pela digestão, colestase ou lesão do epitélio intestinal ou biliar (EVANS, 2009).

A gama glutamiltransferase (GGT) tem como função principal o catabolismo extracelular de glutatona. Lesões hepáticas ou bloqueio de ductos biliares podem causar acúmulo de GGT no fígado e sua secreção em excesso na circulação. Valores elevados de GGT são utilizados para indicar possível doença hepática ou biliar e como um marcador biológico da ingestão excessiva de álcool em humanos (KUNUTSOR, 2016).

Alterações hepáticas nos quadros de leishmaniose visceral são observados especialmente devido a processos inflamatórios pela ação local dos parasitos, ou indicam uma piora no prognóstico nos casos de toxicidade pelo tratamento utilizado (OLIVEIRA

et al., 2010). Nos nossos grupos de tratamento não observamos diferença na produção de enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) em nenhum dos grupos em comparação ao grupo controle, contudo no grupo Glucantime[®] infectado com promastigotas observou-se uma maior produção de FA em comparação ao grupo controle, o que pode indicar uma lesão no tecido hepático. Essa enzima é encontrada em muitos tecidos, mas as concentrações maiores são no epitélio do trato biliar e nas células de Kupffer, sendo que um estudo com crianças tratadas com estibugluconato de sódio, observou elevações nos níveis de FA e de lactato desidrogenase após o tratamento, sugerindo que a lesão ao tecido hepático (principalmente em células parenquimatosas) causou a elevação desses níveis na circulação sanguínea (TAHER et al., 2016). Como não foram observadas alterações no grupo infectado com amastigotas com o mesmo tratamento, pode ter alguma relação com alteração tecidual causada pelo próprio parasito, no entanto são necessários mais estudos para comprovar tais achados.

Os testes de função renal têm utilidade para identificar a presença de doença renal, monitorar a resposta ao tratamento e determinar a progressão da doença renal (GOUNDEN; BHATT; JIALAL, 2021). Ureia e creatinina são os parâmetros bioquímicos comumente mais utilizados para avaliação de alterações renais.

A ureia é um composto nitrogenado, produzido no fígado como produto final do metabolismo das proteínas e do ciclo da ureia. Cerca de 85% da ureia é eliminada pelos rins e o restante pelo trato gastrointestinal. Seus níveis séricos elevam quando a depuração renal está diminuída (insuficiência aguda ou crônica). Também pode ocorrer elevações em quadros de sangramento gastrointestinal, desidratação, estados catabólicos e dietas ricas em proteínas. Em contrapartida a ureia pode estar diminuída em dietas pobres em proteínas e doença hepática grave. Devido a essas variações, a creatinina sérica é uma avaliação mais precisa de doença renal, entretanto, a ureia tende a sofrer um aumento precoce na doença renal, o que não ocorre com os níveis de creatinina (GOUNDEN; BHATT; JIALAL, 2021).

A creatinina é um subproduto do fosfato de creatina e é produzida de forma constante no organismo. Geralmente a creatinina é totalmente eliminada do sangue pelos rins, sendo assim, a diminuição da depuração pelo rim resulta em aumento da creatinina no sangue. A quantidade de creatinina produzida por dia depende do volume muscular. Além disso, a creatinina sérica é um indicador tardio de insuficiência renal, pois a função

renal tem que estar com comprometimento de pelo menos 50% para que se possa observar aumento em seus valores séricos (GOUNDEN; BHATT; JIALAL, 2021).

A insuficiência renal em casos de LV possui uma alta relação com a deposição de imunocomplexos nos rins, bem como pode ser devido a toxicidade dos tratamentos utilizados (ROCHA et al., 2010). Em nossos experimentos não foram observadas alterações nos níveis desses marcadores, entretanto pode haver alguma relação com o tempo de infecção de nossos animais, pois alguns estudos demonstram elevações nos níveis de ureia e creatinina em hamsters infectados com duas cepas de *L. (L.) infantum*, somente a partir de três meses de infecção (MOREIRA et al., 2016). Em humanos existem alguns relatos de fatores de risco devido a complicações renais, com elevação nos níveis de creatinina sérica, contudo, apresenta relação com a toxicidade dos tratamentos utilizados (ROCHA et al., 2010).

7.7 Criptas aberrantes

Bird (1987) descreveu os focos de criptas aberrantes como lesões pré-neoplásicas no cólon de camundongos tratados com substância carcinógena (azoximetano), indicando que essa técnica possui uma facilidade de visualização das alterações em microscópio óptico em curto período de tempo. Essa metodologia tem sido utilizada para avaliar toxicidade de componentes da dieta, de medicamentos e identificação de agentes quimiopreventivos quando associados a substâncias carcinogênicas como a 1,2-Dimetilhidrazina (BIRD, 1987; DE OLIVEIRA et al., 2014; WARGOVICH et al., 2000). Os compostos utilizados em nosso estudo, por se tratarem de novas moléculas, ainda apresentam poucos dados de toxicidade *in vivo*, dessa forma o ensaio para a pesquisa de criptas aberrantes em cólon de animais saudáveis, submetidos aos tratamentos com os compostos em questão, podem nos indicar que os mesmos não foram capazes de causar danos estruturais ao cólon dos animais, nem como indução de alterações pré-neoplásicas, que é o que ocorre com a DMH, uma substância que induz um quadro de alteração colorretal semelhante ao carcinoma de cólon em humanos, no qual a maioria dos tumores são distribuídos em região distal de cólon (MA; WILLIAMSON; ROWLANDS, 2002). Assim sugere-se ausência de toxicidade em região de intestino grosso nas condições utilizadas no estudo, especialmente por ter sido utilizada a via oral como escolha para o tratamento.

7.8 Micronúcleo

O teste de micronucleo consiste em analisar quebras ou distúrbios de cromátide em divisões mitóticas que, após a telófase, uma proporção dessa cromatina deslocada não foi incorporada ao núcleo das células-filhas, e então formam micronúcleos únicos ou múltiplos no citoplasma dessas células (VON LEDEBUR; SCHMID, 1973). Os micronúcleos são encontrados em diferentes células da medula óssea de animais tratados com substâncias mutagênicas como mieloblastos, mielócitos e eritroblastos, mas a maior parte é observada em eritrócitos policromáticos (VON LEDEBUR; SCHMID, 1973).

O ensaio de micronúcleo é uma triagem rápida, que avalia danos citogenéticos na medula óssea, com uma classificação das substâncias que podem ser causadoras de quebras ou aberrações cromossômicas, ou aquelas que têm alta probabilidade de causar dano citogenético (MACGREGOR et al., 1987). Tem sido aplicado como um teste de genotoxicidade *in vivo* (DAMASCENO et al., 2016; LEANDRO et al., 2013) e em tratamentos para leishmaniose foi utilizado, juntamente com ensaio de cometa, para comprovar a genotoxicidade de miltefosina (CASTELO BRANCO et al., 2016). Assim, podemos sugerir, que nenhum dos compostos foram capazes de induzir genotoxicidade em medula óssea nos animais pelo protocolo de tratamento utilizado.

8 CONCLUSÕES

- Podemos concluir que os compostos HDAB e GE apresentaram atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, com baixos valores de toxicidade contra macrófagos de hamsters isoladamente, assim como apresentaram um efeito aditivo quando em associação em promastigotas e um aumento na toxicidade em macrófagos com a associação dos compostos.
- Foi possível padronizar o modelo hamster para a detecção dos compostos isolados e em associação no plasma, para a análise farmacocinética utilizando-se da metodologia de UPLC-MS/MS.
- Foi observada redução da carga parasitária significativa nos grupos tratados com a associação 75/25 e infectados com formas amastigotas tanto em fígado, quanto em baço, sendo que nesse grupo também se observou uma melhor preservação das estruturas do tecido nas análises histopatológicas, contudo no perfil de resposta imune celular não foram encontradas diferenças significativas nesse grupo para as citocinas efetoras no controle da leishmaniose visceral.
- Observou-se uma marcada variação de resposta do hospedeiro entre as infecções com formas promastigotas e amastigotas, tanto em relação à carga parasitária, resposta imune e alterações histopatológicas, sendo necessários outros estudos para comprovar tais diferenças e avaliar possíveis mecanismos.
- Os compostos não apresentaram toxicidade em provas de função hepática e renal nos ensaios bioquímicos, não se observou danos ao cólon nem mesmo genotoxicidade em medula óssea.
- Levando em conta todos os resultados obtidos, os compostos utilizados, HDAB e GE, especialmente a combinação 75/25, possuem um potencial terapêutico para o tratamento da leishmaniose visceral, de forma adicional ou coadjuvante ao tratamento, tendo sido realizado por via oral, o que facilita a aceitação e adesão ao tratamento.

ANEXO A




Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade anti-Leishmania de composto alquiltriazol em hamster dourado" protocolo nº 015/16 sob a responsabilidade de Márcia Dalastra Laurenti e Juliana Barbosa Nunes, apresentado pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.03.16

Vigência do Projeto	Dezembro/2019
Espécie/linhagem	Hamster
Nº de animais	Material estocado
Peso/Idade	Material estocado
Sexo	Material estocado
Origem	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 09 de Março de 2016



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 16.05.17, APROVOU o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 015/16 intitulado "Avaliação da atividade anti-Leishmania de composto alquiltriazol em hamster dourado" apresentado pelo Departamento de Patologia.

- Alteração do título para: "Avaliação da atividade anti-Leishmania de compostos fenólicos em hamster dourado"

Pesquisador Responsável: Márcia Dalastra Laurenti

CEUA-FMUSP, 16 de Maio de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8 REFERÊNCIAS

- ACHALKUMAR, A. S. et al. Self-assembly of hecates-tris (n -salicylideneaniline) into columnar structures: synthesis and characterization. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 527–544, 2013.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T Helper1/T Helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 80, 2012.
- ALVAR, J. et al. The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, p. 223–274, 2006.
- ALVES, G. B. B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 310–315, 2010.
- ATRI, C.; GUERFALI, F.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.
- AULNER, N. et al. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating leishmania amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2154, 2013.
- BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228–1231, 2000.
- BAILEN, M. et al. new bioactive semisynthetic derivatives of 31-norlanostenol and obtusifoliol from *Euphorbia Officinarum*. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 6, p. 733–738, 2016.
- BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 2016.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: A parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545–548, 1992.
- BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon

treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. **Cancer Letters**, v. 37, n. 2, p. 147–151, 1987.

BISPO, A. J. B. et al. Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0228176, 2020.

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, n. 4, p. e1019, 2011.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2012. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>.

Acesso em: 16 dez. 2016

BRETAGNE, S. et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828, 2001.

BUCHETON, B. et al. The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 14, p. 1449–1457, 2002.

BUFFET, P. A. et al. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2167–2168, 1995.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and Interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 113, 2005.

CALDERÓN, Á. I. et al. Evaluation of larvicidal and in vitro. antiparasitic activities of plants in a biodiversity plot in the altos de campana national park, Panama. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 7, p. 487–498, 2006.

CARAVACA, F. et al. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. **American Journal of Nephrology**, v. 11, n. 4, p. 350–2, 1991.

CASTELO BRANCO, P. V. et al. The antileishmanial drug miltefosine (Impavido®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 806, p. 34–39, 2016.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Leishmaniasis - Disease**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 24 nov. 2020.
- CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 674–88, 2001.
- CHATTERJEE, M. et al. Inadequacy of 12-Week Miltefosine Treatment for Indian Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 4, p. 767–769, 2015.
- CLEMENTI, A. et al. Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. **Clinical Kidney Journal**, v. 4, n. 3, p. 147–152, 2011.
- 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, 2011.
- COLOMBO, F. A. et al. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a *L. (L.) infantum* hypothetical protein as target in canine samples. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 156–162, 2015.
- COLOMBO, F. A. et al. *In vivo* evaluation of leishmanicidal activity of benzophenone derivatives by qPCR. **Medicinal chemistry**, v. 07, n. 05, p. 890–893, 2017.
- CORBETT, C. E. P. et al. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 73, n. 4, p. 417–433, 1992.
- COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010.
- CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478–1483, 2011.
- CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319–342, 2002.
- DA COSTA, A. P. et al. Environmental factors and ecosystems associated with canine visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 12, p. 765–774, 2015.
- DA SILVA, J. C. et al. Leishmanicidal activity *in vivo* of a miltefosine derivative in *Mesocricetus auratus*. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105539, 2020.

- DA SILVA JUNIOR, G. B.; GUARDÃO BARROS, E. J.; DE FRANCESCO DAHER, E. Kidney involvement in leishmaniasis—a review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 434–440, 2014.
- DALTON, J. E. et al. Inhibition of receptor tyrosine kinases restores immunocompetence and improves immune-dependent chemotherapy against experimental leishmaniasis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 1204–1216, 2010.
- DAMASCENO, J. L. et al. Protective effects of *Solanum cernuum* extract against chromosomal and genomic damage induced by methyl methanesulfonate in Swiss mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1111–1115, 2016.
- DANHOF, M. et al. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling in translational drug research. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 186–191, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.
- DAS, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 99, 2012.
- DASGUPTA, S. et al. Visceral leishmaniasis with pleural effusion in an immunocompetent patient. **Lung India**, v. 31, n. 1, p. 56, 2014.
- DE ALMEIDA, L. et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 93–99, 2015.
- DE ALMEIDA, L. et al. In vivo antileishmanial activity and histopathological evaluation in *Leishmania infantum* infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 536–547, 2017.
- 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. 1–2, p. 159–167, 2006.
- DE MUYLDER, G. et al. A Screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS**

- Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.
- DE OLIVEIRA, P. F. et al. Bixin protects hepatocytes against 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity but does not suppress DNA damage and pre-neoplastic lesions in the colon of Wistar rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 759, p. 37–42, 2014.
- DEA-AYUELA, M. A. et al. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for *in vivo* testing of antileishmanial compounds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 6, p. 703–717, 2007.
- DOS-SANTOS, W. L. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 491, 2014.
- DOS SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315–317, 1998.
- DUARTE, M. I. et al. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 6, p. 431–436, 1986.
- DUARTE, M. I. S. et al. Interstitial nephritis in human kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 531–537, jan. 1983.
- DUARTE, M. I. S. et al. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 73–76, 1989.
- DUARTE, M. I. S.; CORBETT, C. E. P. Histopathological and ultrastructural aspects of interstitial pneumonitis of experimental visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 5, p. 683–688, 1984.
- EDUARDO PEREIRA CORBETT, C.; DALASTRA LAURENTI, M. Early detection of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in draining lymph node after subcutaneous inoculation in hamster. **Parasitology International**, v. 47, n. 4, p. 307–310, 1998.
- EFSTRATIADIS, G. et al. Renal involvement in a patient with visceral leishmaniasis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 1, p. 235–236, 2006.
- EL HAG, I. A. et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 6, p. 547–551, 1994.
- EUGSTER, A. K.; ALBERT, P. J.; KALTER, S. S. Multiple enzyme determinations in sera and livers of tumor bearing hamsters. **Experimental Biology and Medicine**, v.

123, n. 2, p. 327–331, 1966.

EVANS, G. O. **Animal Clinical Chemistry**. CRC Press, 2009.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 2004.

FLANDIN, J.-F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411–420, 2006.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 5, p. 1857–64, 1993.

GABRIELSSON, J; WEINER, D. **Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications**. 3a. ed. Estocolmo: Swedish Pharmaceutical Press, 2000.

GAO, S. et al. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite in rat plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 5, p. 472–478, 2010.

GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdian involves T-helper 17 cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016–1025, 2013.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 615–623, 2004.

GOUNDEN, V.; BHATT, H.; JIALAL, I. **Renal Function Tests**. StatPearls Publishing. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507821/> Acesso em: 20 nov 2020.

GRAZIELLE, E. R. et al. Phytochemical profile, antibacterial, antioxidant and cytotoxicity activities of *Euphorbia cotinifolia*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 19–25, 2015.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and

are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GUPTA, R. et al. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 440–443, 2012.

HERMIDA, M. D'EL-R. et al. Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 394, 2018.

JACKSON, D. N. et al. *Garcinia xanthochymus* benzophenones promote hyphal apoptosis and potentiate activity of fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6032–6038, 2015.

KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 239–253, 2004.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: Where are we today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 177, 2010.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 156, 2013.

KONG, F. et al. Transcriptional profiling in experimental visceral leishmaniasis reveals a broad splenic inflammatory environment that conditions macrophages toward a disease-promoting phenotype. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006165, 2017.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 107–114, 2005.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 251, 2012.

KUMAR, P. V.; DANESHBOD, Y.; SADEGHIPOOR, A. *Leishmania* in the glomerulus. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 128, n. 8, p. 935–936, 2004.

KUNUTSOR, S. K. Gamma-glutamyltransferase-friend or foe within? **Liver International**, v. 36, n. 12, p. 1723–1734, 2016.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of

american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LAMOTTE, S. et al. Discovery of novel hit compounds with broad activity against visceral and cutaneous *Leishmania* species by comparative phenotypic screening.

Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 438, 2019.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.

LAURENTI, M. D. et al. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 71, n. 6, p. 791–7, 1990.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 427–434, 2004.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2010.

LEANDRO, L. F. et al. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays.

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 753, n. 2, p. 101–106, 2013.

LENTA, B. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1548–1557, 2007.

LEPROHON, P. et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 1, p. 26–35, 2015.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory Complex II. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1788–1798, 2010.

MA, Q.-Y.; WILLIAMSON, K. E.; ROWLANDS, B. J. Variability of cell proliferation

- in the proximal and distal colon of normal rats and rats with dimethylhydrazine induced carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 5, p. 847–852, 2002.
- MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, n. 2, p. 103–12, 1987.
- MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3114–3119, 2013.
- MALTEZOU, H. C. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 192–8, 2008.
- MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 251–262, 2004.
- MARAN, N. et al. Host resistance to visceral leishmaniasis: prevalence and prevention. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 14, n. 4, p. 435–442, 2016.
- MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. 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, 2001.
- MEDINA-COLORADO, A. A. et al. Splenic CD4⁺ T cells in progressive visceral leishmaniasis show a mixed effector-regulatory phenotype and impair macrophage effector function through inhibitory receptor expression. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169496, 2017.
- MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 401–413, 1997.
- 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, 2001.
- MILLS, K. H. G. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 10, p. 2636–2649, 2008.
- MIRALLES, G. D. et al. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 1058–1063, 1994.

- MOHAN, S. et al. In vitro protection of biological macromolecules against oxidative stress and in vivo toxicity evaluation of *Acacia nilotica* (L.) and ethyl gallate in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 257, 2014.
- MOREIRA, N. DAS 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, 2016.
- MUKHERJEE, A. K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565–572, 2012.
- MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, 2001.
- MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–267, 2008.
- MUXEL, S. M. et al. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.
- MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do euphorbiaceae tick as medicinal plants? a review of euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652–662, 2011.
- NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015.
- 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.
- NIETO, C. G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1–2, p. 33–47, 1992.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1277–1285, 2012.
- OLIVEIRA, J. M. DE et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.

43, n. 2, p. 188–193, 2010.

OLIVEIRA, A. V. et al. Mesangial proliferative glomerulonephritis associated with progressive amyloid deposition in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. **The American Journal of Pathology**, v. 120, n. 2, p. 256–262, 1985.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 595–602, 2010.

OSORIO, E. Y. et al. Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, p. e1004165, 2014.

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, n. 8, p. 1076–1083, 2001.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, 2014.

PADRÓN ROMERO, M. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis and mixed cryoglobulinemia as a form of presentation of visceral leishmaniasis. **American Journal of Case Reports**, v. 21, p. e921445, 2020.

PALLERIA, C. et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 7, p. 601–610, 2013.

PATEL, B. et al. The simultaneous UPLC-MS/MS determination of emerging drug combination; candesartan and chlorthalidone in human plasma and its application. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 9, p. e3946, 2017.

PAUN, A. et al. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 1, p. e1001246, 2011.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339–345, 2010.

PETER, W; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniases in biology and medicine. **Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 642, 1988.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–87, 2009.

PONTE-SUCRE, A.; DÍAZ, E.; PADRÓN-NIEVES, M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Vienna: Springer Vienna, 2013.

- QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.
- REBELLO, K. M. et al. Miltefosine-lopinavir combination therapy against *Leishmania infantum* infection: *in vitro* and *in vivo* approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 229, 2019.
- REIMÃO, J. Q. et al. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 195–199, 2012.
- REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1032–1038, 2011.
- 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, 2000.
- RIÇA-CAPELA, M. et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, v. 89, n. 3, p. 163–169, 2003.
- ROCHA, N. A. et al. Risk factors for acute kidney injury in visceral leishmaniasis (Kala-Azar). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 449–453, 2010.
- ROCHETTE, A. et al. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 32–47, 2009.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 2016.
- ROLLINO, C. Acute renal failure in leishmaniasis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 9, p. 1950–1951, 2003.
- ROMERO, G. A S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.
- ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a north american isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

- ROUSSEAU, D. et al. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **European Cytokine Network**, v. 12, n. 2, p. 340–347, 2001.
- SAHA, S. et al. IL-10- and TGF- β -mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: The significance of amphotericin b in the control of *Leishmania donovani* infection in India. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5592–5603, 2007.
- SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, T. M. A. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 217–221, 2003.
- SAMBROOK J, FRITSCH E, M. T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.
- SEIFERT, K. et al. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 850–854, 2011.
- SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.
- SERENO, D. et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, v. 56, n. 1, p. 3–7, 2007.
- SILVA-O'HARE, J. et al. Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: changes in homing and survival of plasma cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156733, 2016.
- SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009.
- SILVA, L. C. et al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 133–143, 2013.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous

- leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525–534, 2005.
- SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. S17–S20, 2006.
- SOE, W. M. et al. In vitro drug interactions of gallates with antibiotics in *Staphylococcus Aureus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 668–672, 2010.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 98, 2012.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology & Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- STAPLETON, P. D. et al. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 462–467, 2004.
- STAUBER, L. A.; FRANCHINO, E. M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. **The Journal of Protozoology**, v. 5, n. 4, p. 269–273, 1958.
- SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.
- SUNDAR, S. et al. Amphotericin B treatment for indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 5, p. 556–561, 2007.
- 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, n. 7, p. 325–328, 2008.
- TAHER, J. H. et al. Lactate dehydrogenase (LD), alkaline phosphatase (ALP) isoenzymatic patterns in Iraqi children with visceral leishmaniasis before and after treatment with stibogluconate. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 277–284, 2016.
- TALLARIDA, R. J.; KIMMEL, H. L.; HOLTZMAN, S. G. Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. **Psychopharmacology**, v. 133, n. 4, p. 378–382, 1997.
- TERRAZAS, C. et al. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral

- leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 3, p. 1135–1143, 2016.
- THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Koogan, Guanabara, 2015.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.
- TORNIO, A. et al. Clinical studies on drug–drug interactions involving metabolism and transport: methodology, pitfalls, and interpretation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 6, p. 1345–1361, 2019.
- VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010.
- VAN GRIENSVEN, J.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 443–444, 2011.
- VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.
- VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605–610, 1977.
- VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAIVA, N. G. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 423–429, 2005.
- VIANNA, V. L. P.; TAKIYA, C. M.; DE BRITO-GITIRANA, L. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 9, p. 829–836, 2002.
- VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test. Methodological aspects. **Mutation Research**, v. 19, n. 1, p. 109–117, 1973.
- VOOTURI, S. K. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of benzophenone-based tetraamides as novel antibacterial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5020–5031, 2009.
- WARGOVICH, M. J. et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 6, p. 1149–1155, 2000.

WASHINGTON, I. M.; VAN HOOSIER, G. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**. 1. ed. Seattle: Elsevier:Academic Press, 2012.

WILSON, M. E. et al. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. **The Journal of Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 55, 1987.

WILSON, M. E. et al. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6148–6155, 1998.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO | Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

APÊNDICE A

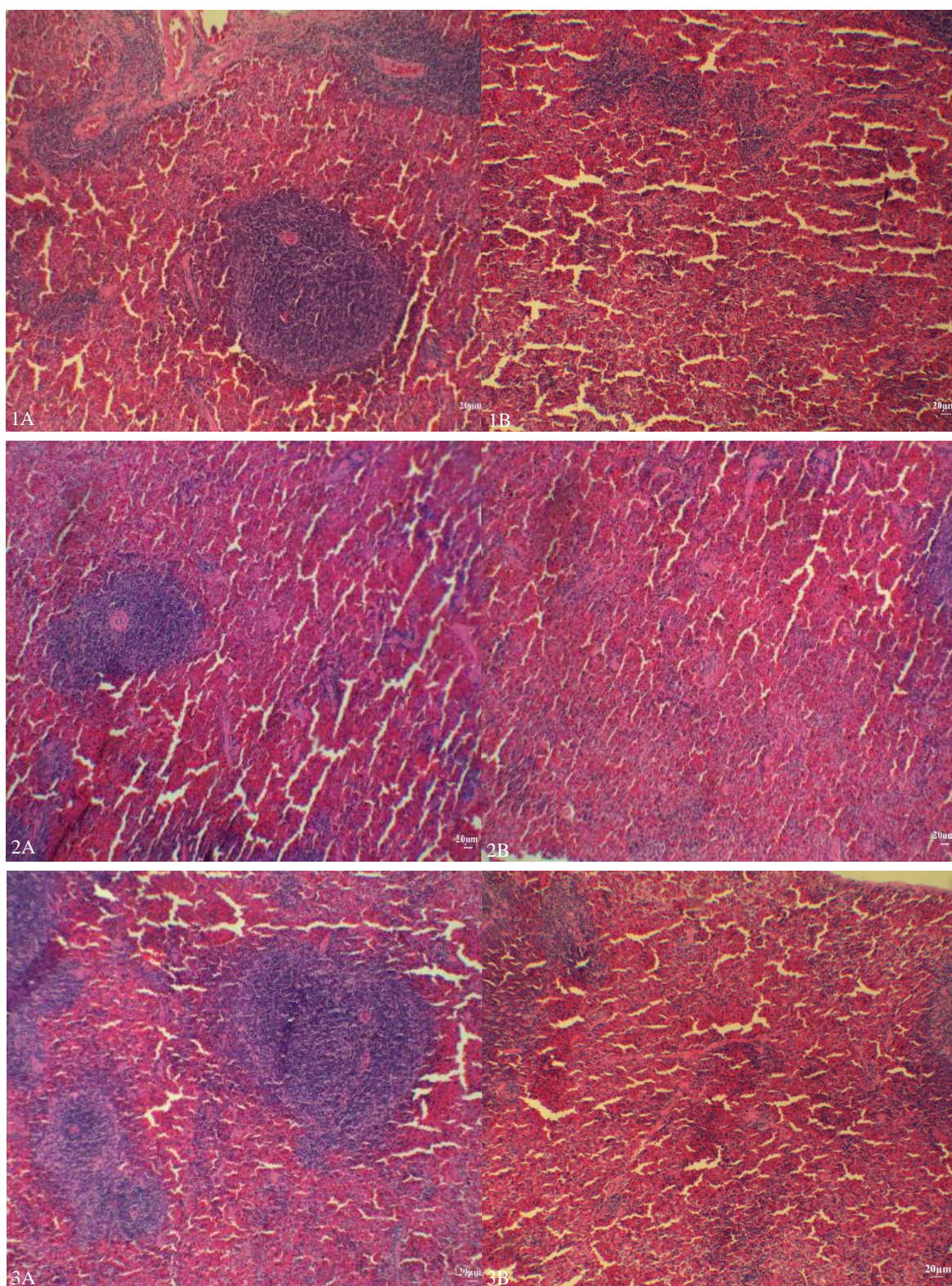


Figura 27 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A) Polpa branca, grupo controle. (1B) Polpa vermelha, grupo controle. (2A) Polpa branca, grupo tratado com HDAB. (2B) Polpa vermelha, grupo tratado com HDAB. (3A) Polpa branca, grupo tratado com 75/25. (3B) Polpa vermelha, grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE B

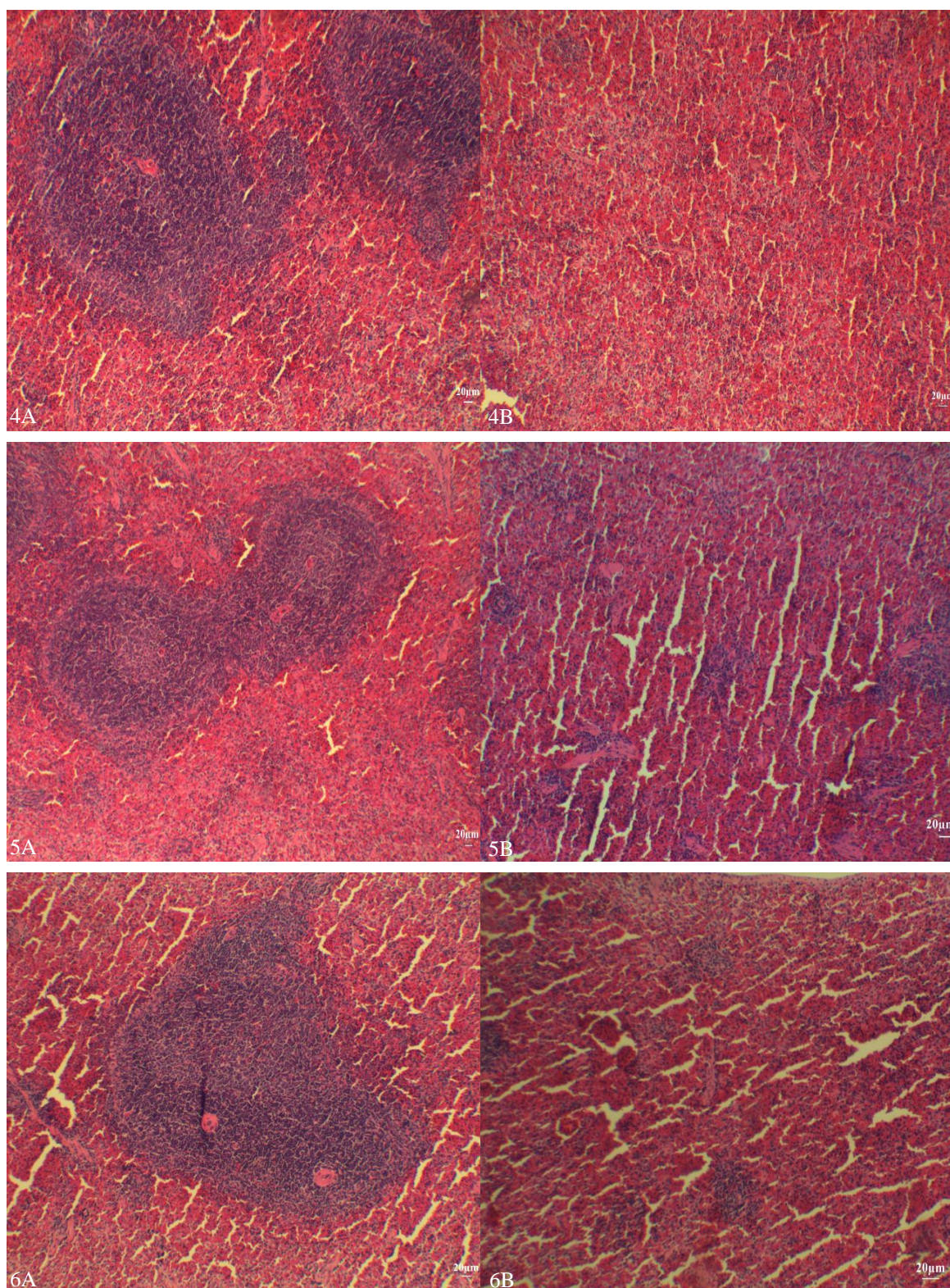


Figura 28 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baços de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A) Polpa branca, tratado com 50/50. (4B) Polpa vermelha, grupo tratado com 50/50. (5A) Polpa branca, grupo tratado com 25/75. (5B) Polpa vermelha, grupo tratado com 25/75. (6A) Polpa branca, grupo tratado com GE. (6B) Polpa vermelha, grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE C

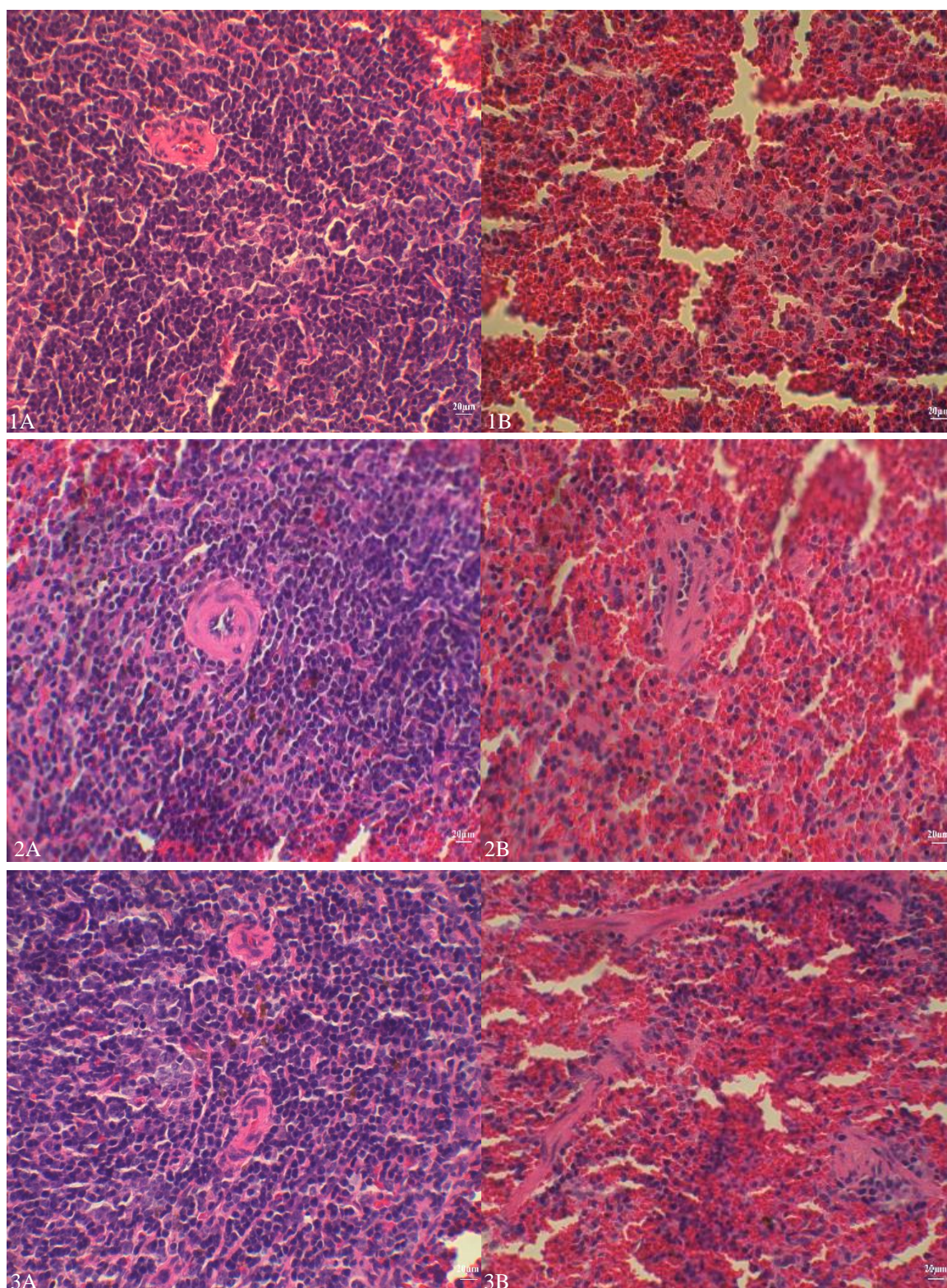


Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baços de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A) Polpa branca, grupo controle. (1B) Polpa vermelha, grupo controle. (2A) Polpa branca, grupo tratado com HDAB. (2B) Polpa vermelha, grupo tratado com HDAB. (3A) Polpa branca, grupo tratado com 75/25. (3B) Polpa vermelha, grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE D

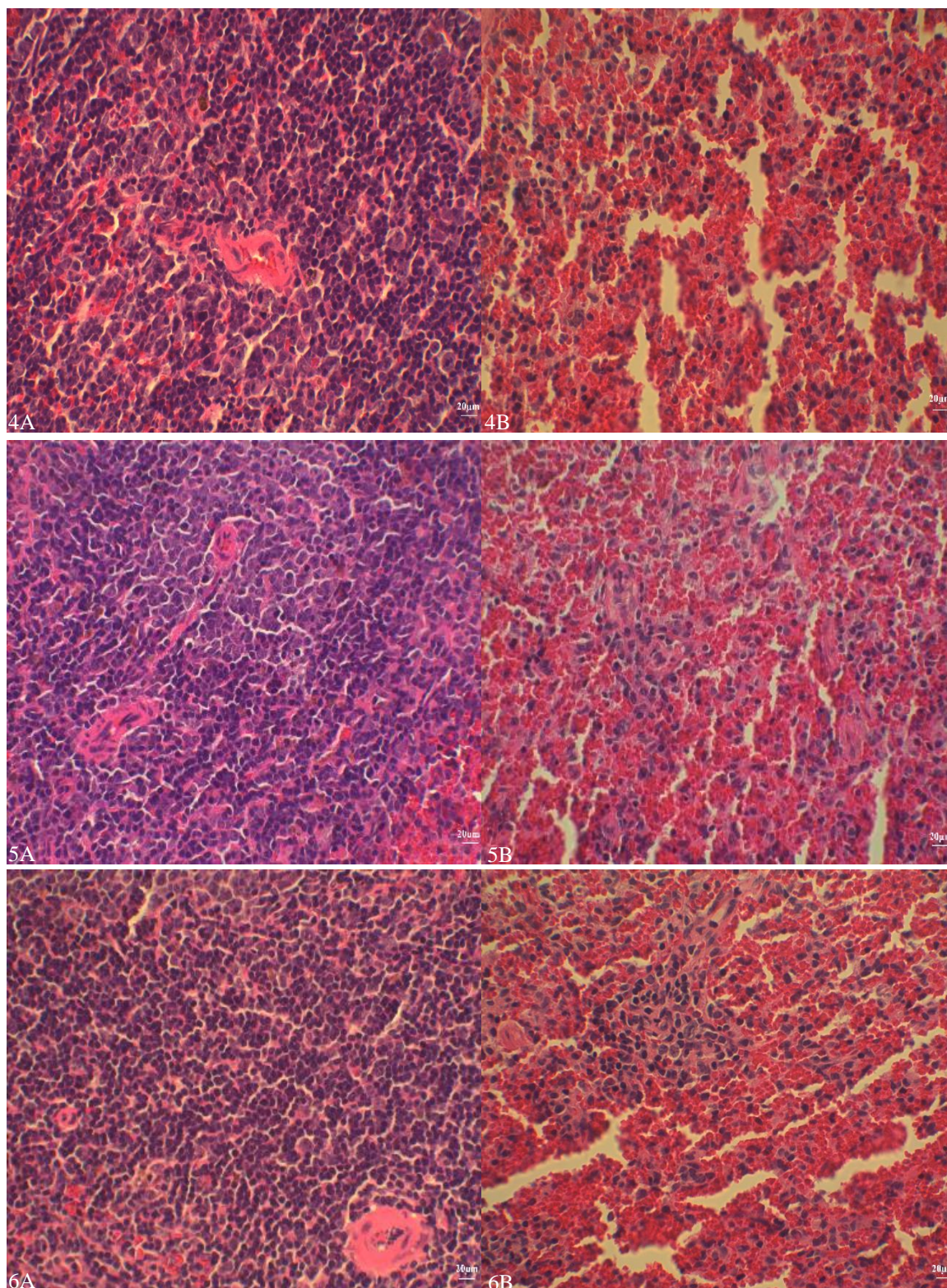


Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baços de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A) Polpa branca, tratado com 50/50. (4B) Polpa vermelha, grupo tratado com 50/50. (5A) Polpa branca, grupo tratado com 25/75. (5B) Polpa vermelha, grupo tratado com 25/75. (6A) Polpa branca, grupo tratado com GE. (6B) Polpa vermelha, grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE E

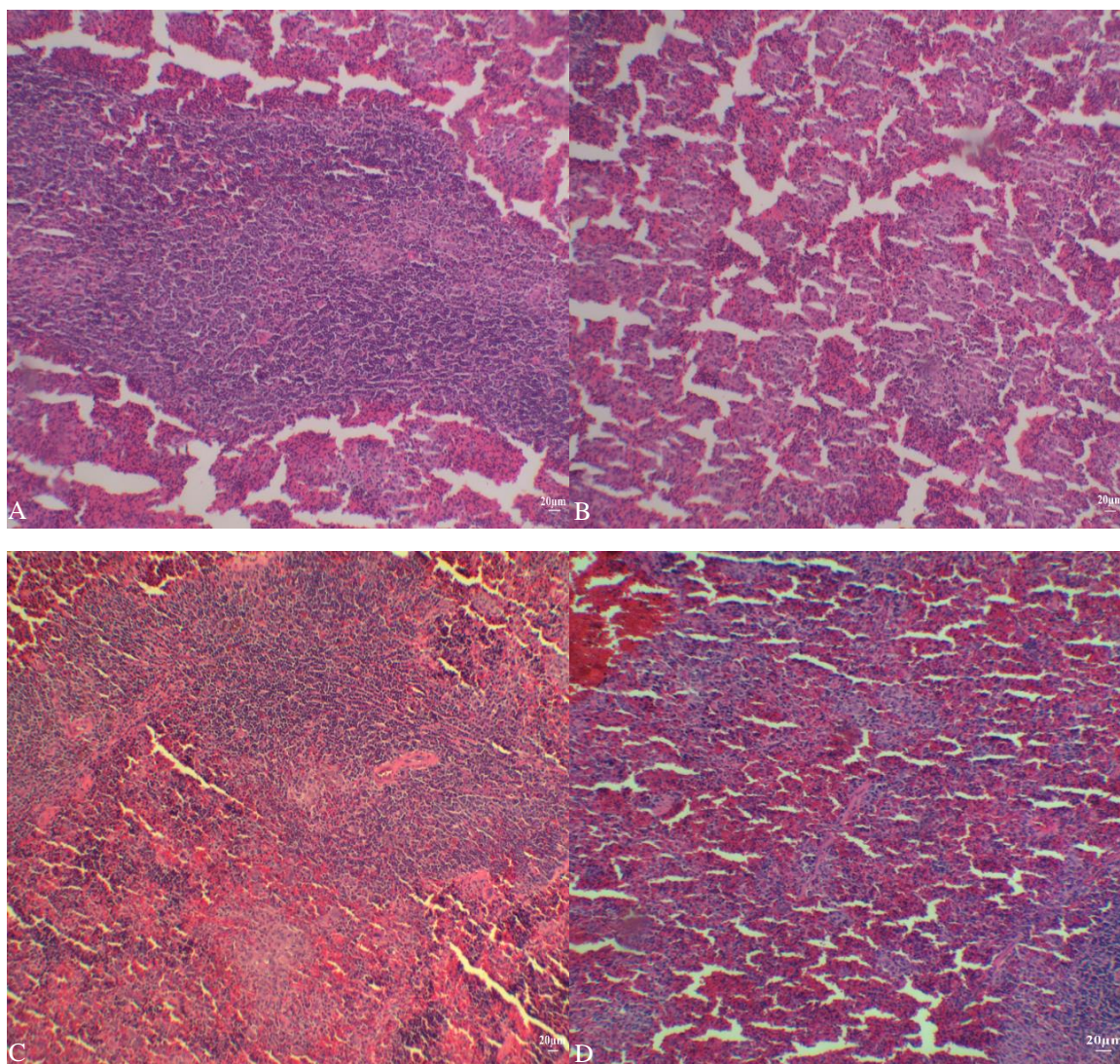


Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters de grupos infectados não tratados.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE F

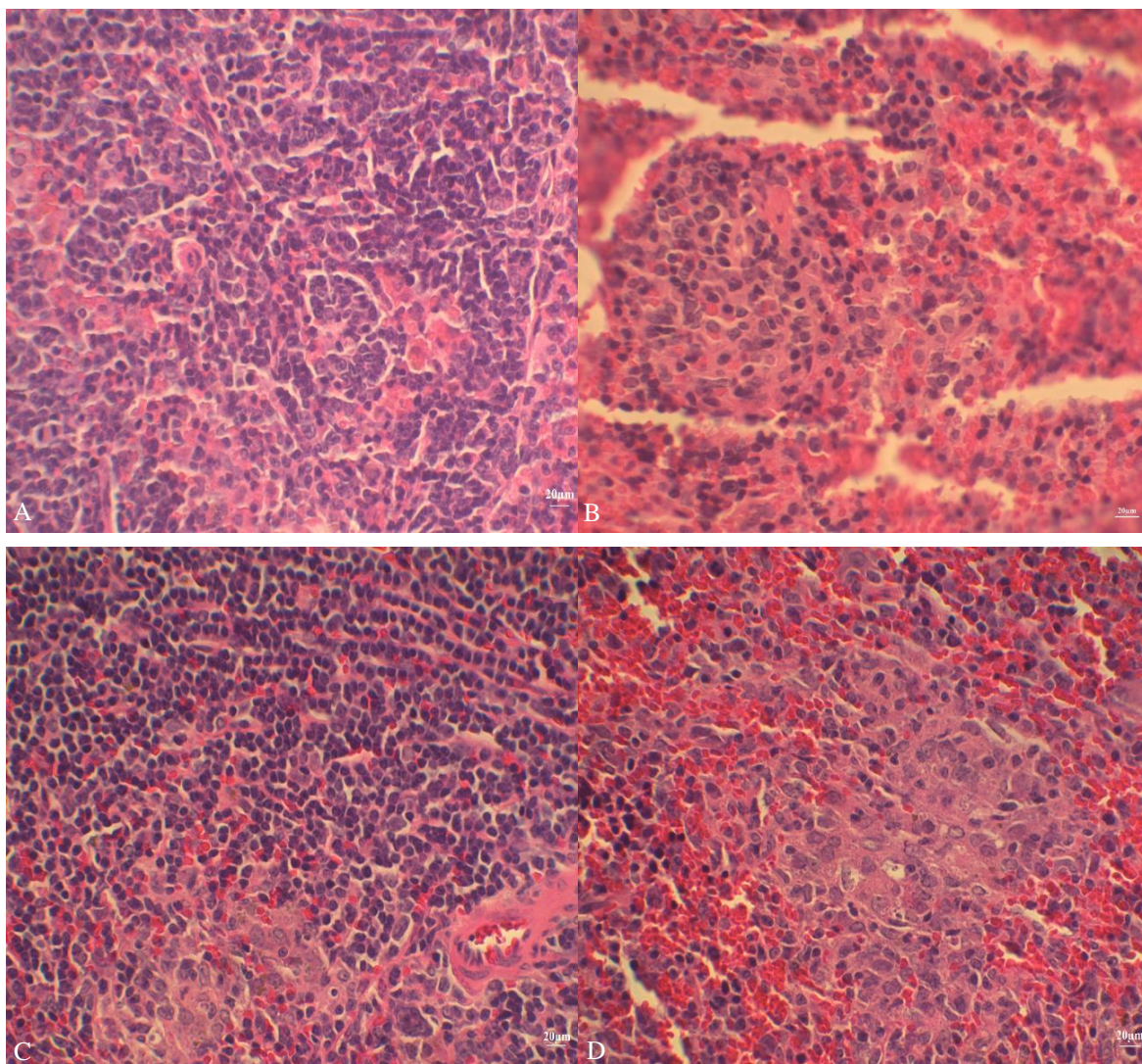


Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters de grupos infectados não tratados.

NOTA : (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE G

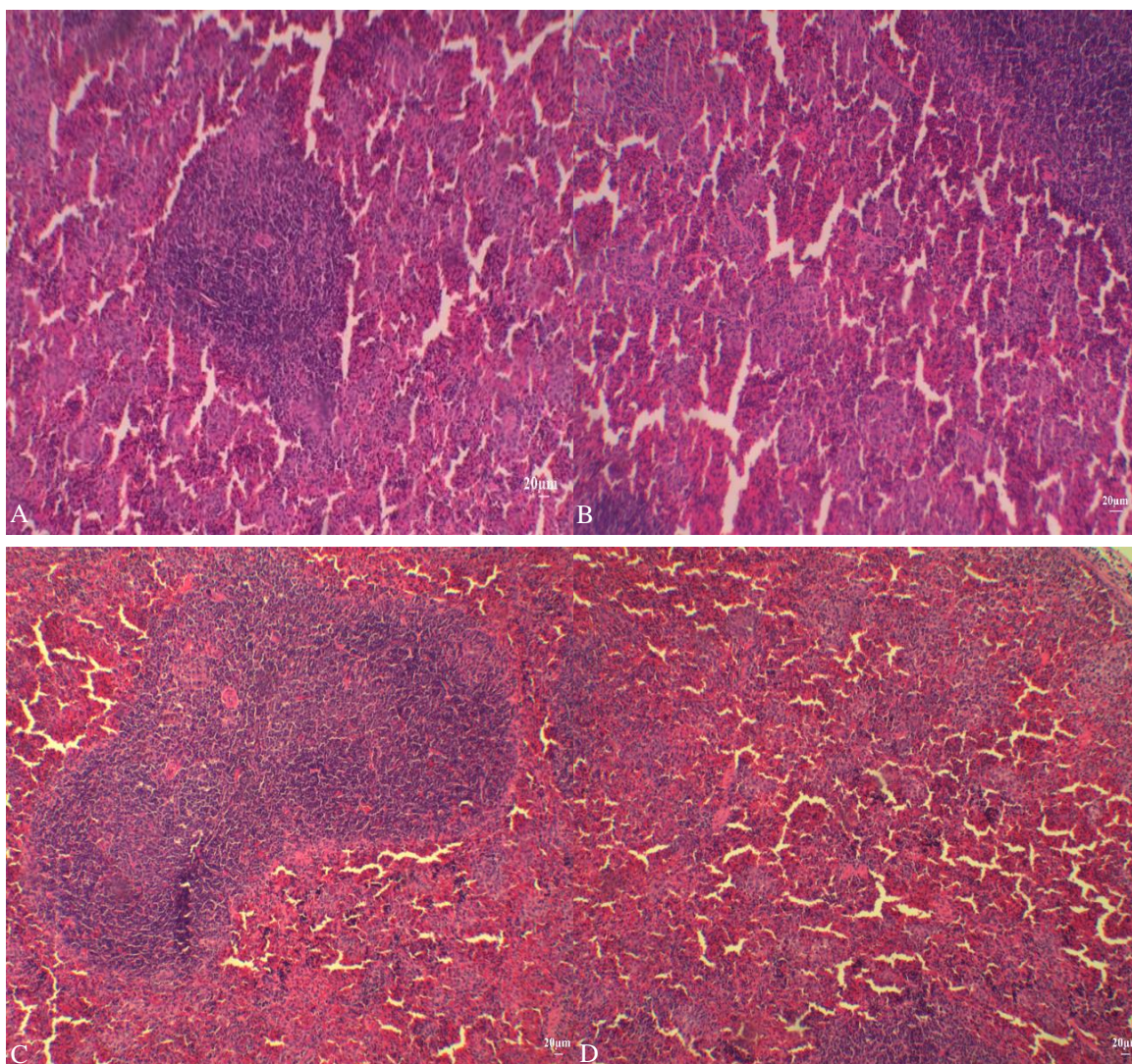


Figura 33 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com HDAB.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE H

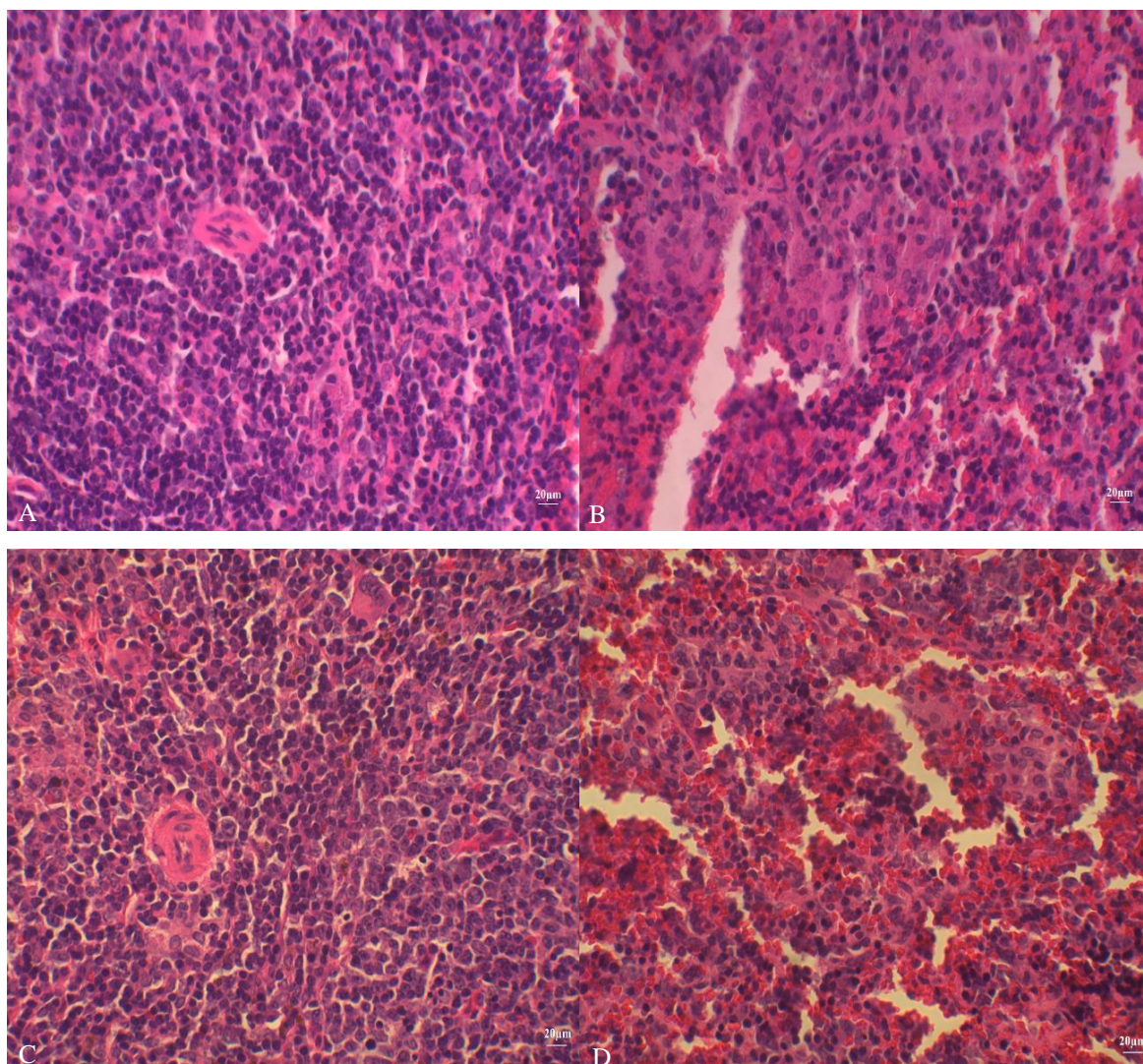


Figura 34 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com HDAB.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE I

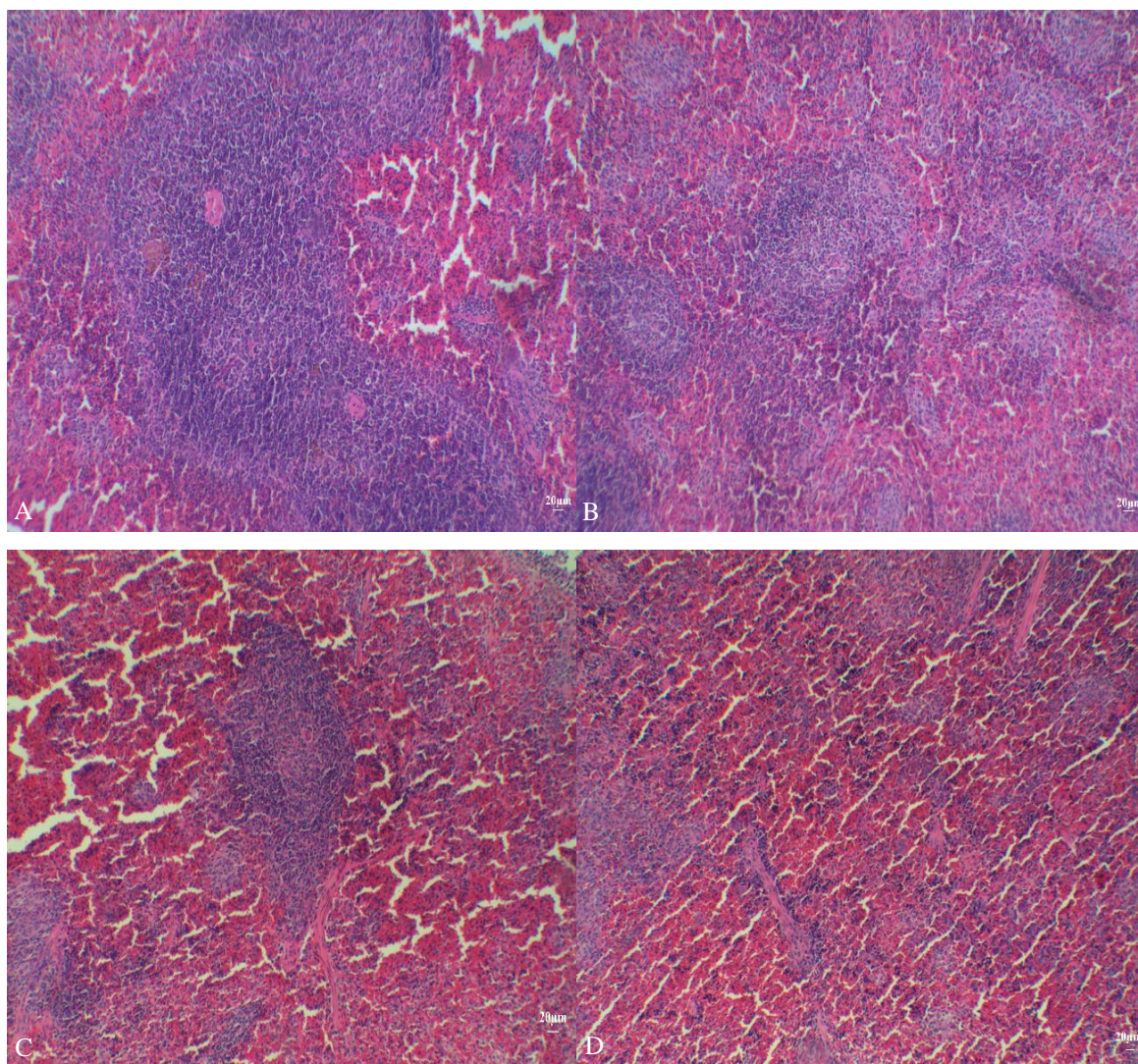


Figura 35- Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 75/25.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE J

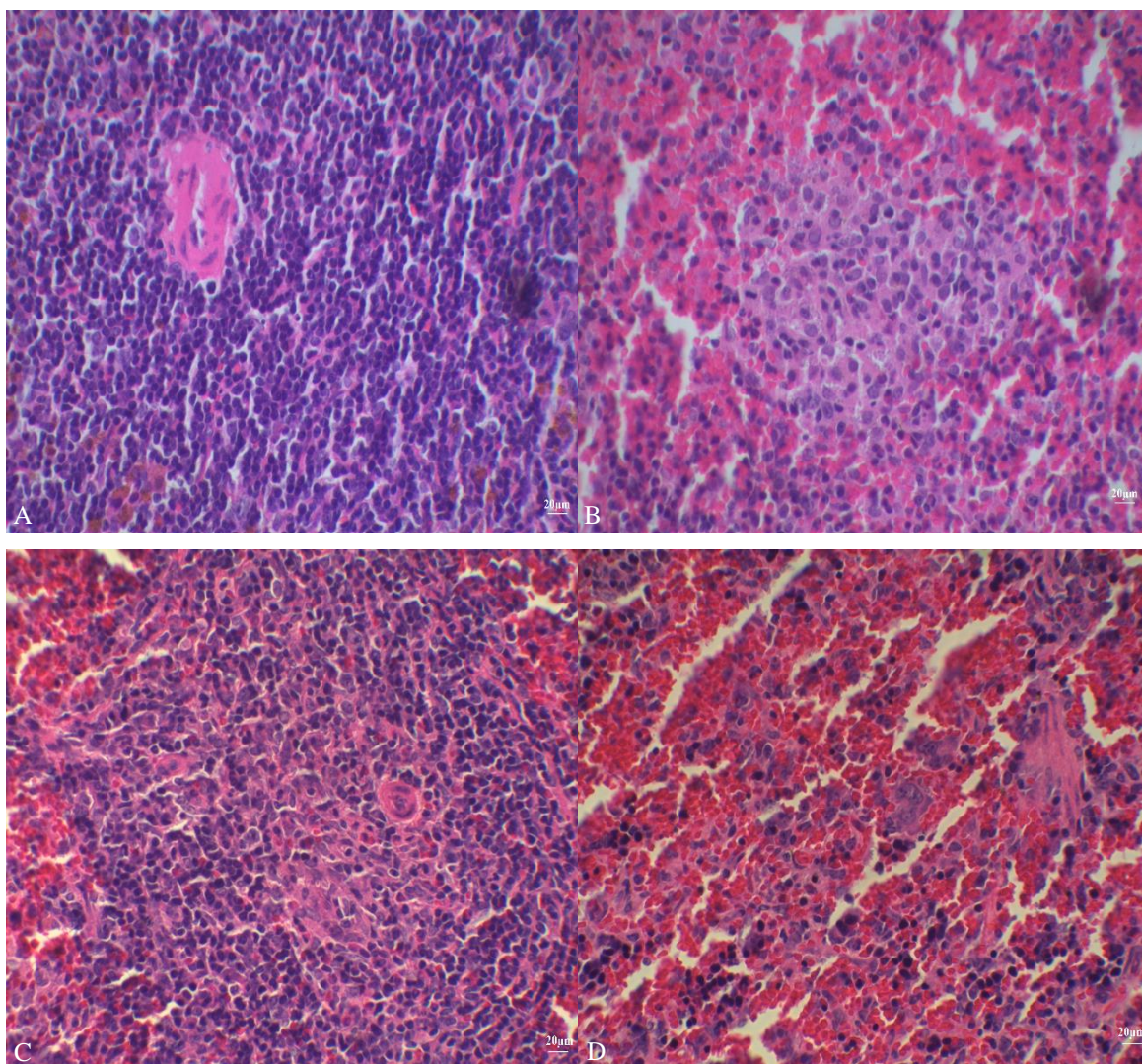


Figura 36 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 75/25.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE K

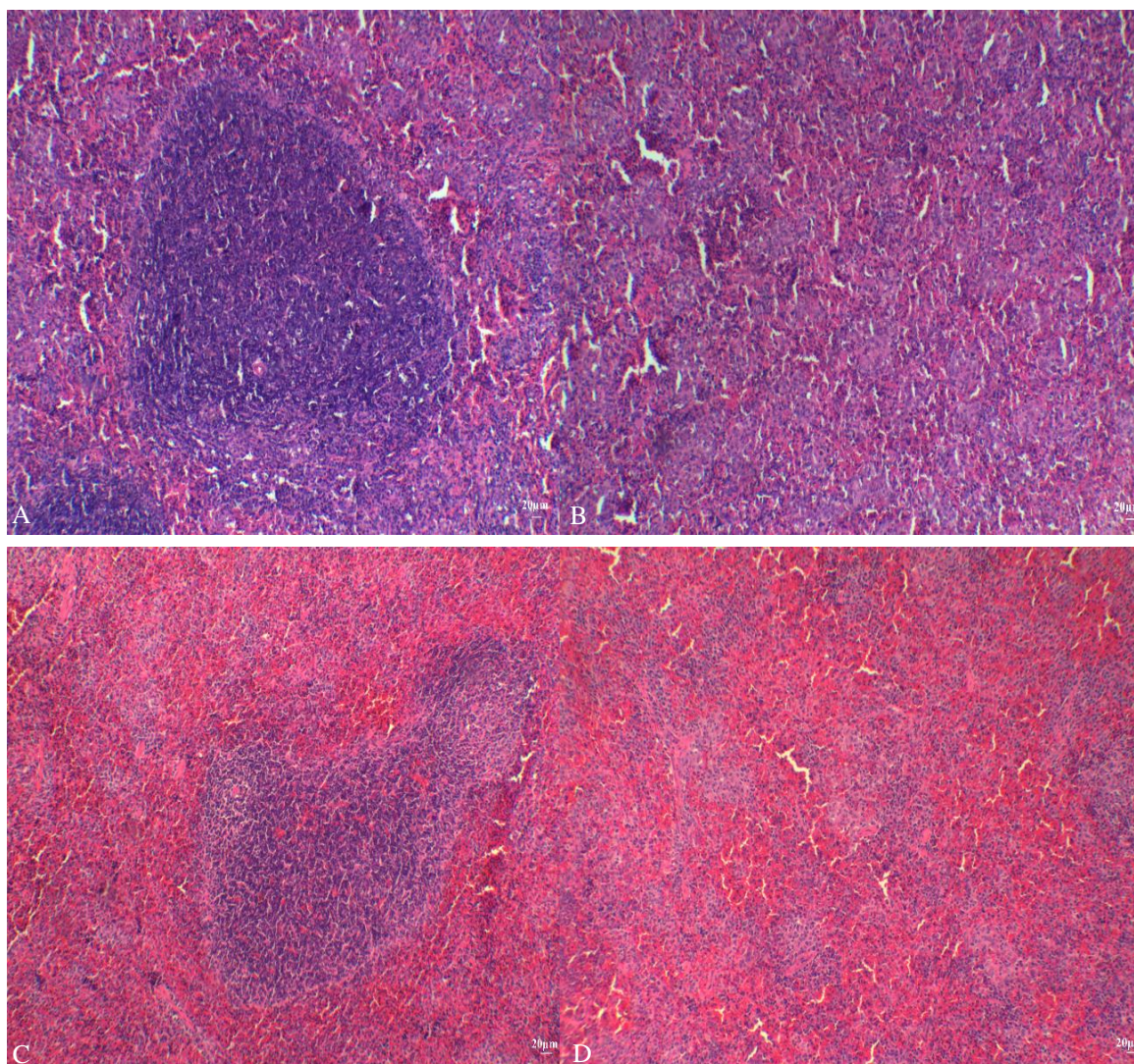


Figura 37 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 50/50.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE L

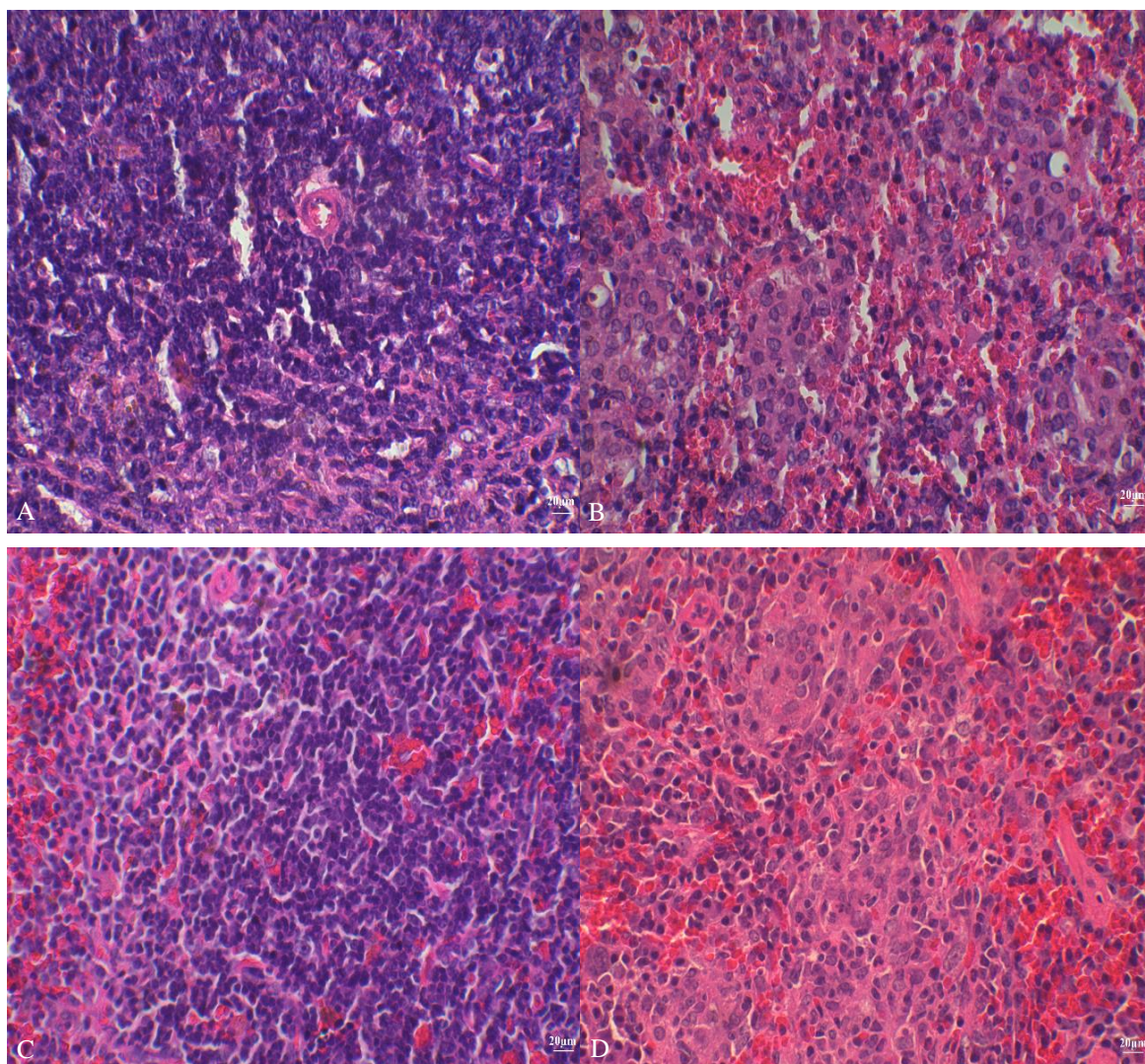


Figura 38- Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 50/50.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE M

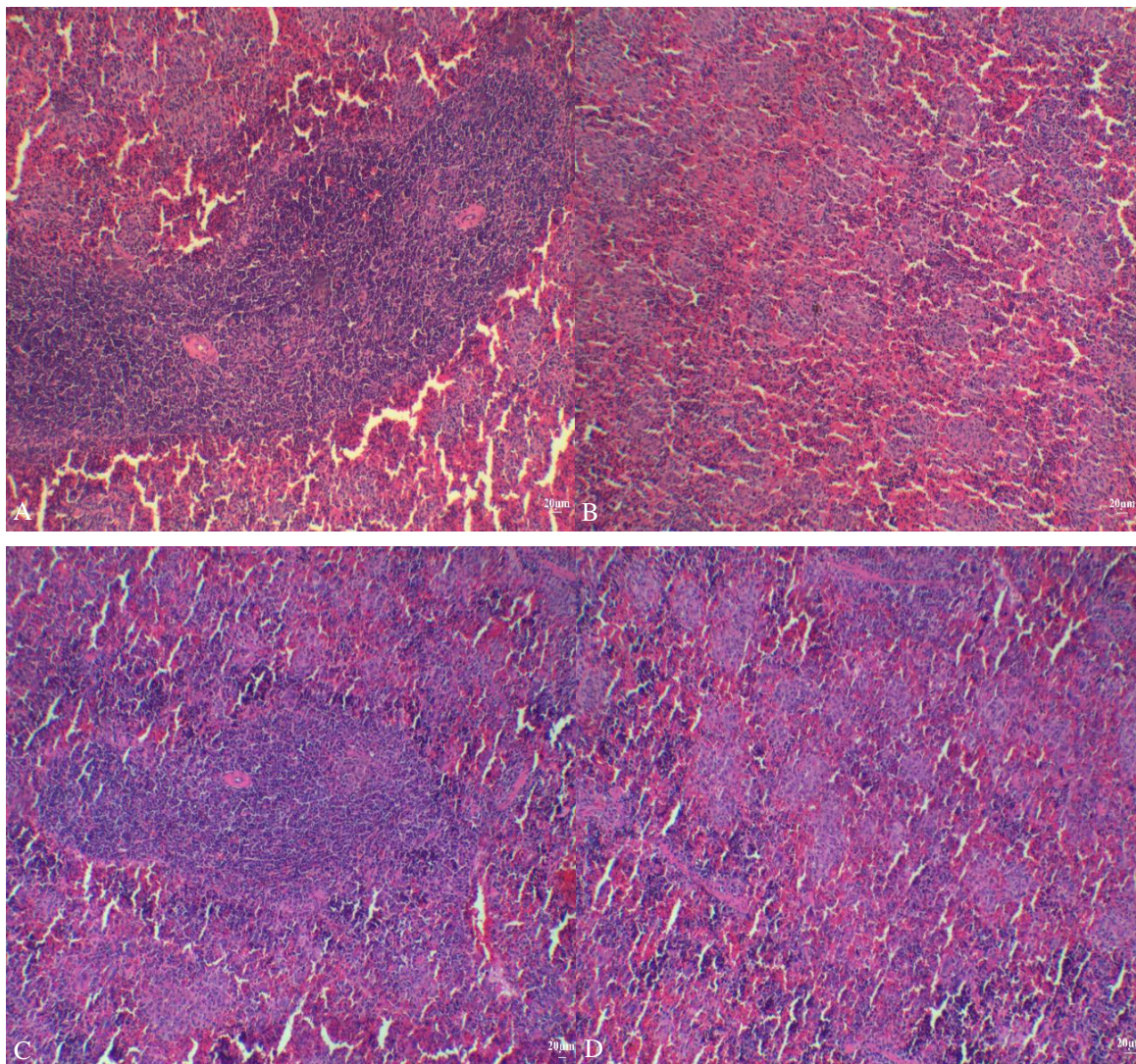


Figura 39- Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 25/75.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE N

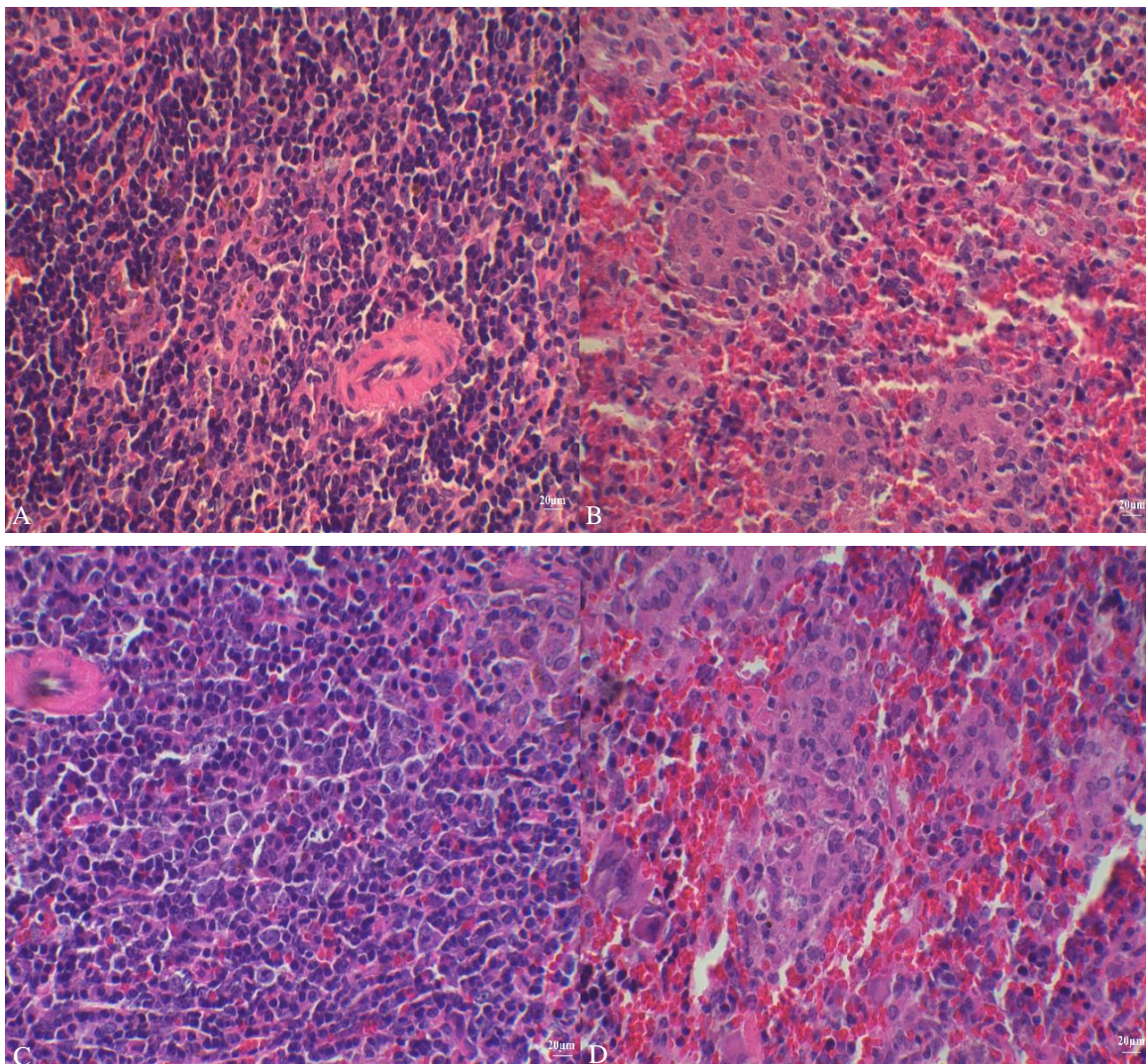


Figura 40 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com 25/75.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE O

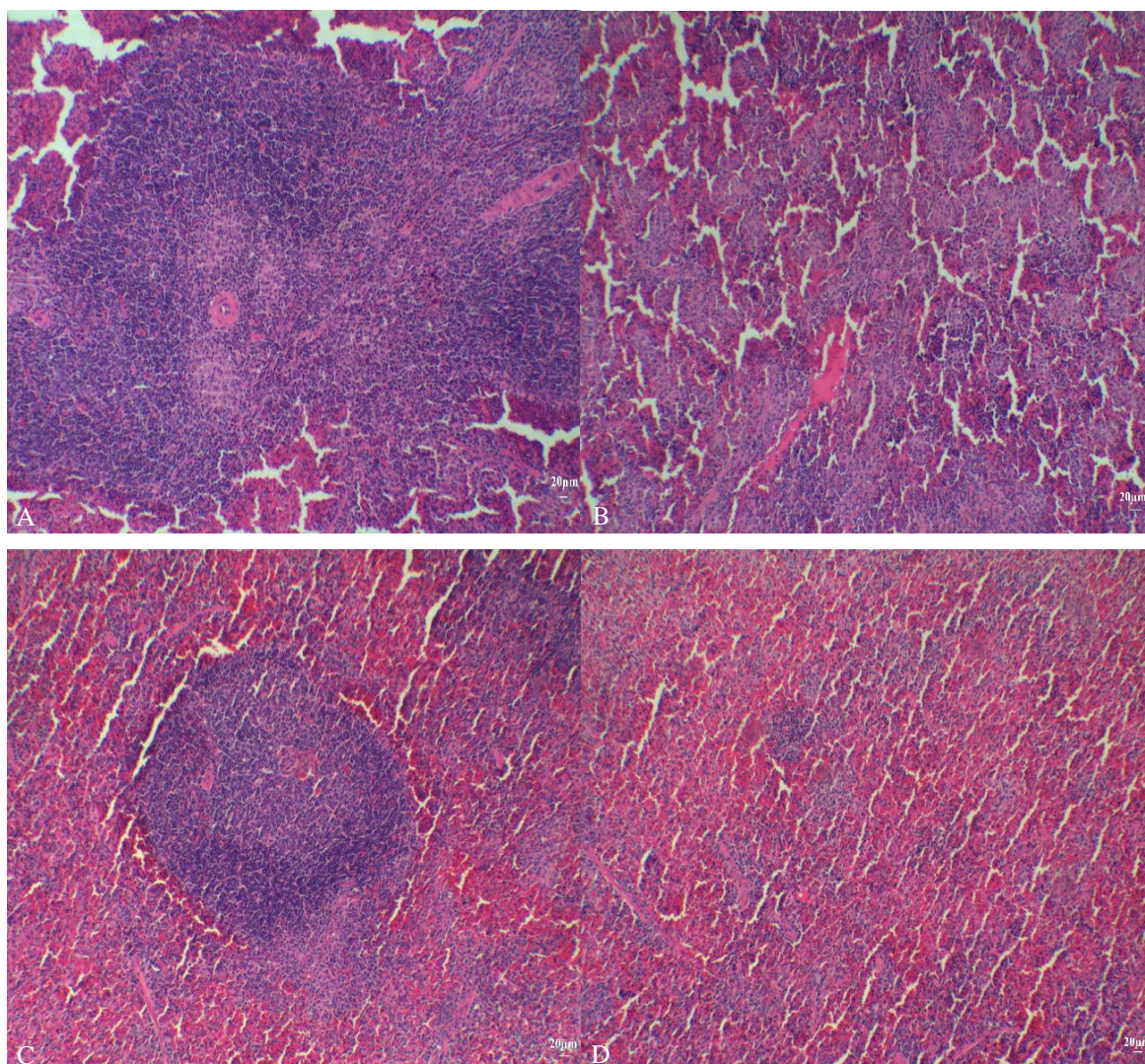


Figura 41 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com GE.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE P

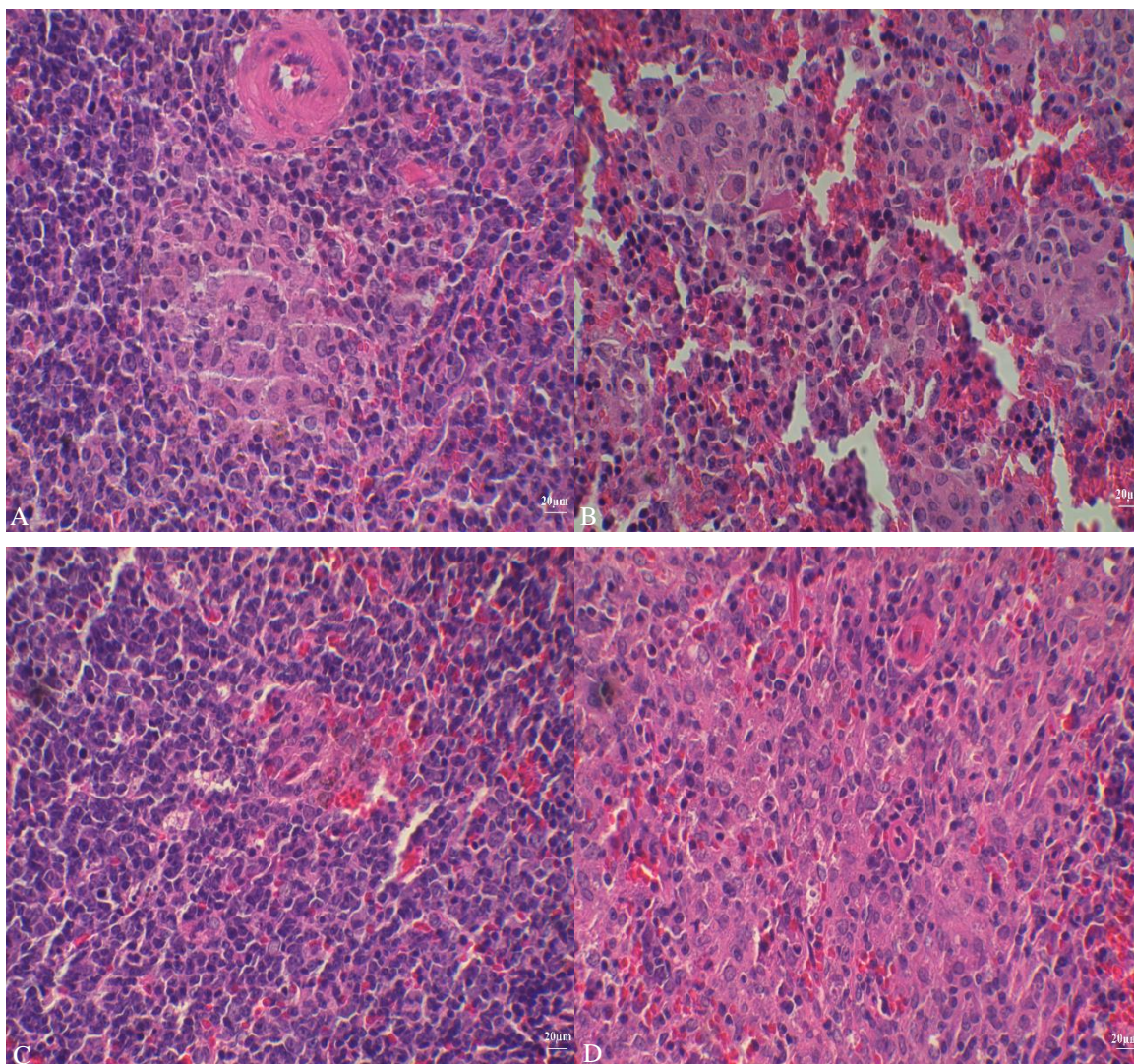


Figura 42 - Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com GE.

NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE Q

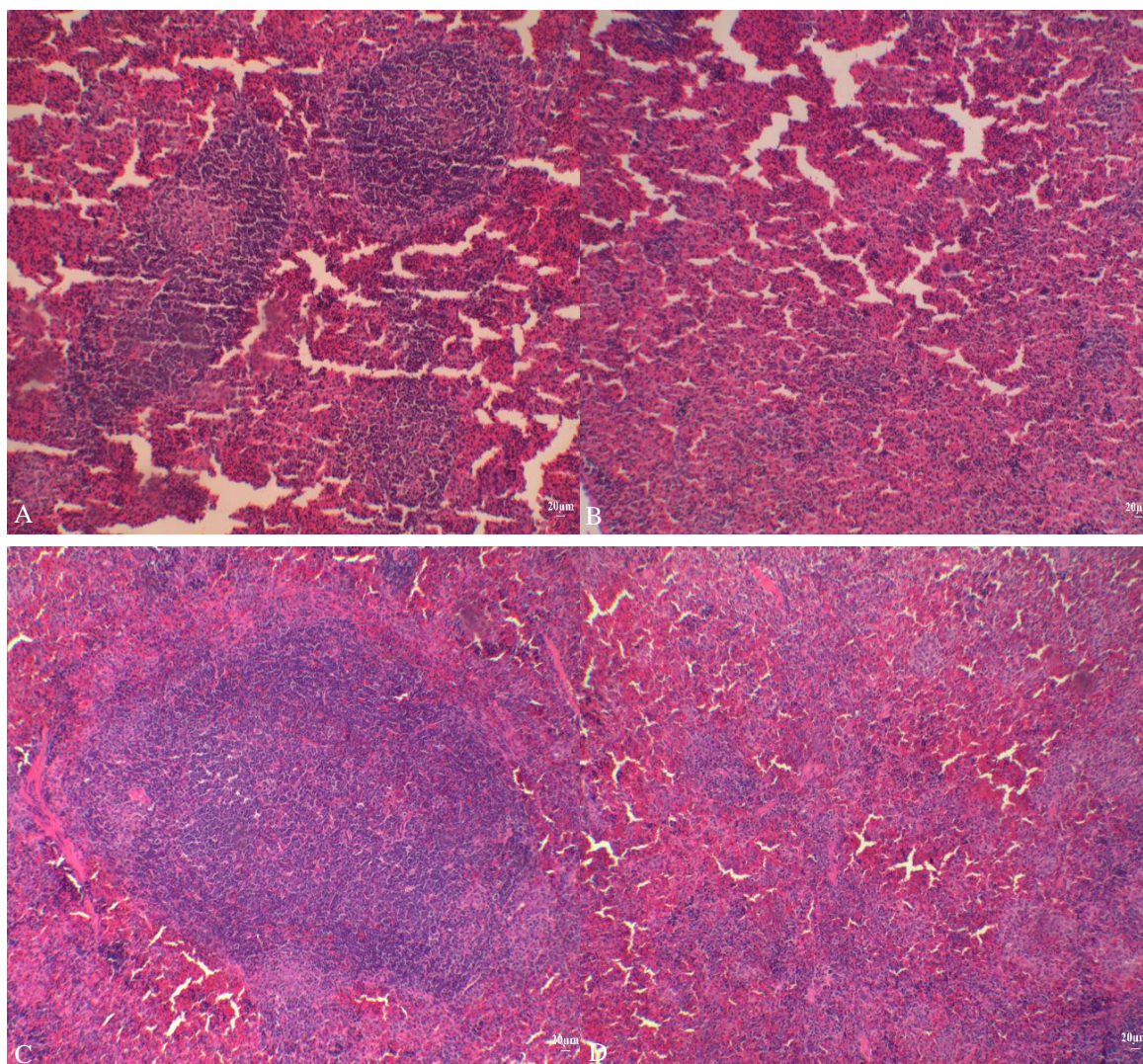


Figura 43- Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com Glucantime®. NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE R

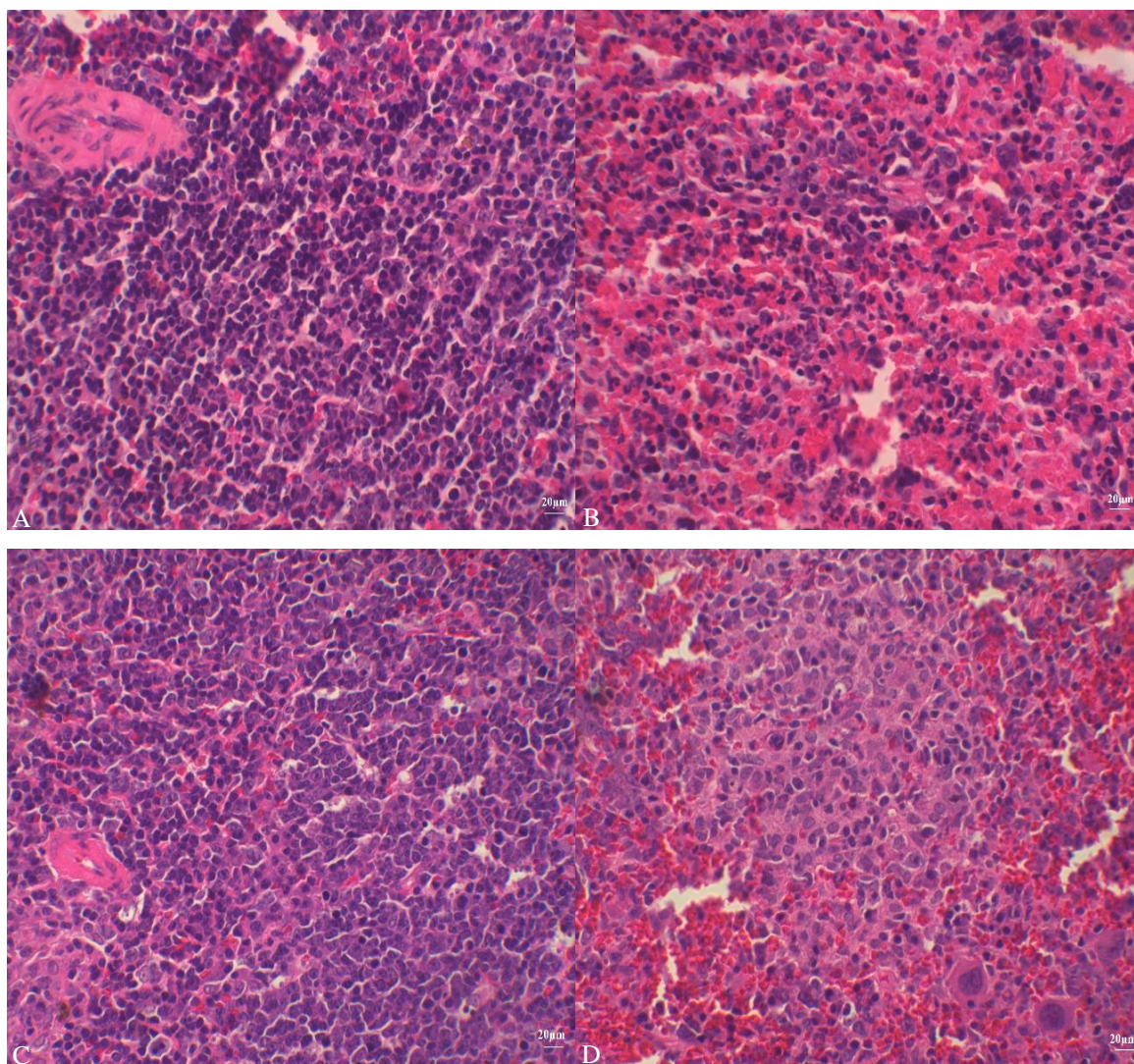


Figura 44- Fotomicrografias de cortes histológicos de baço de hamsters infectados tratados com Glucantime®. NOTA: (A) Polpa branca, grupo infectado com promastigotas. (B) Polpa vermelha, grupo infectado com promastigotas. (C) Polpa branca, grupo infectado com amastigotas. (D) Polpa vermelha, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE S

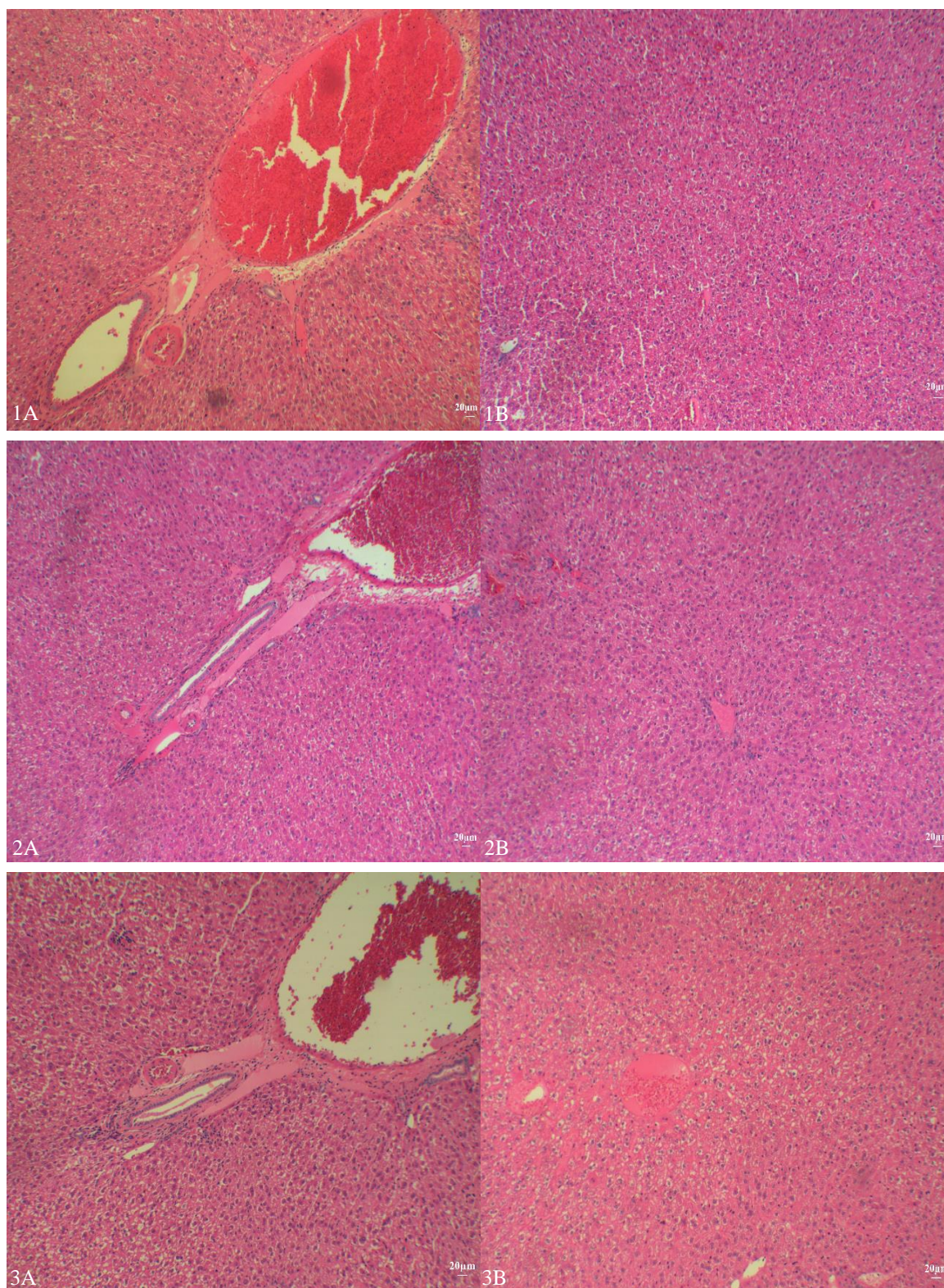


Figura 45 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A) Espaço porta, grupo controle. (1B) Parenquima hepático, grupo controle. (2A) Espaço porta, grupo tratado com HDAB. (2B) Parenquima hepático, grupo tratado com HDAB. (3A) Espaço porta, grupo tratado com 75/25. (3B) Parenquima hepático, grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE T

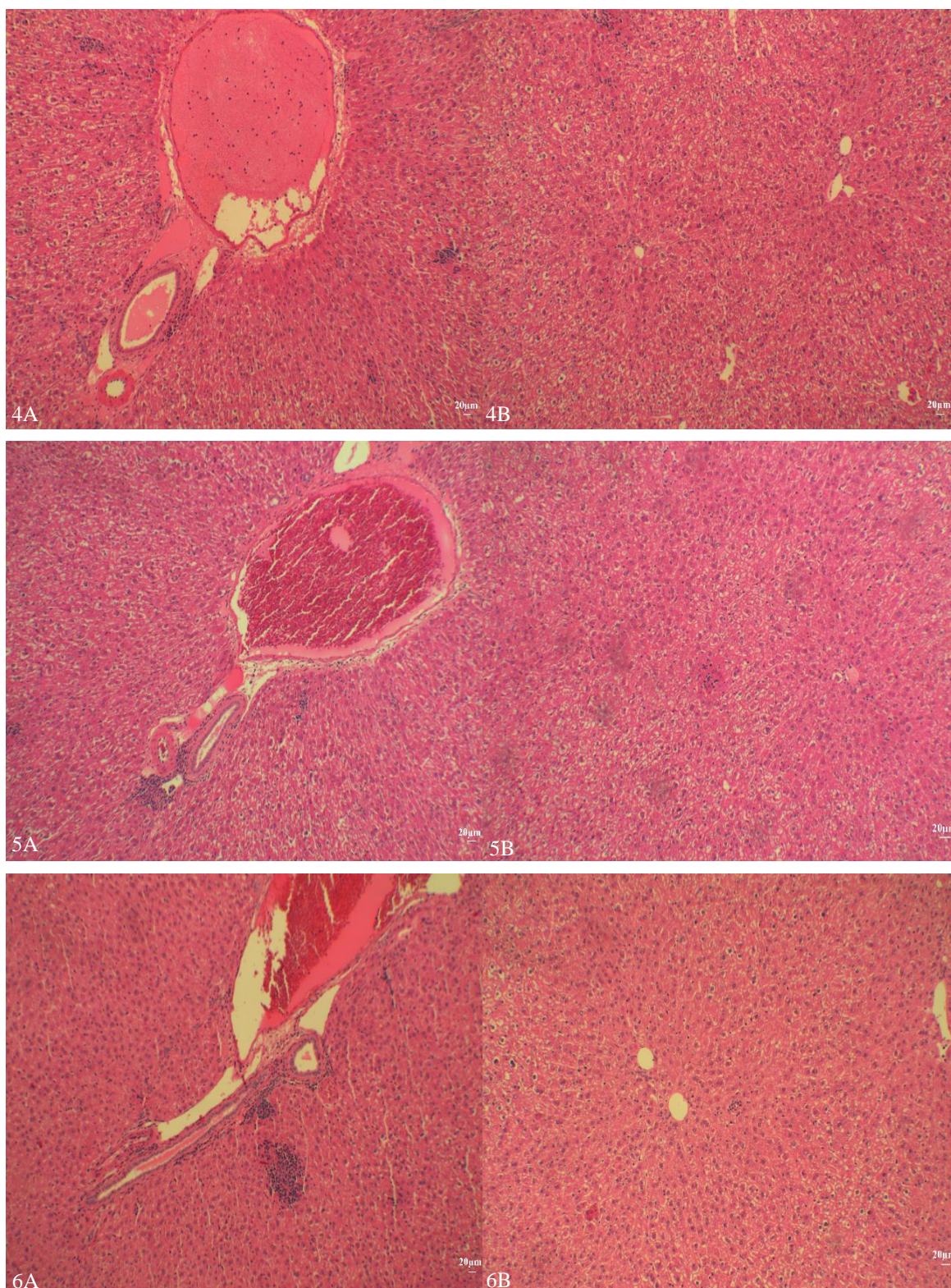


Figura 46 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A) Espaço porta, grupo tratado com 50/50. (4B) Parenquima hepático, grupo tratado com 50/50. (5A) Espaço porta, grupo tratado com 25/75. (5B) Parenquima hepático, grupo tratado com 25/75. (6A) Espaço porta, grupo tratado com GE. (6B) Parenquima hepático, grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE U

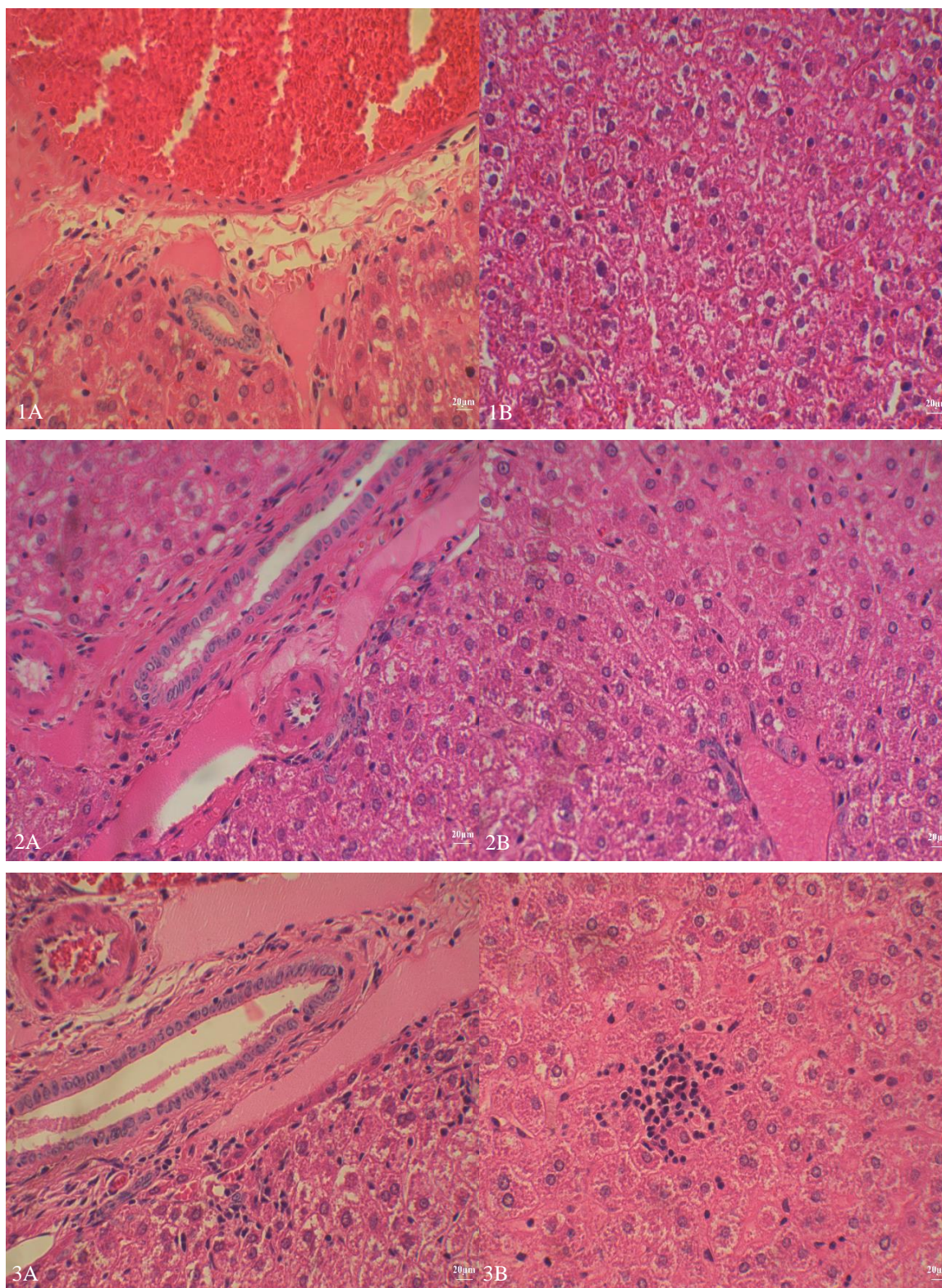


Figura 47 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A) Espaço porta, grupo controle. (1B) Parenquima hepático, grupo controle. (2A) Espaço porta, grupo tratado com HDAB. (2B) Parenquima hepático, grupo tratado com HDAB. (3A) Espaço porta, grupo tratado com 75/25. (3B) Parenquima hepático, grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE V

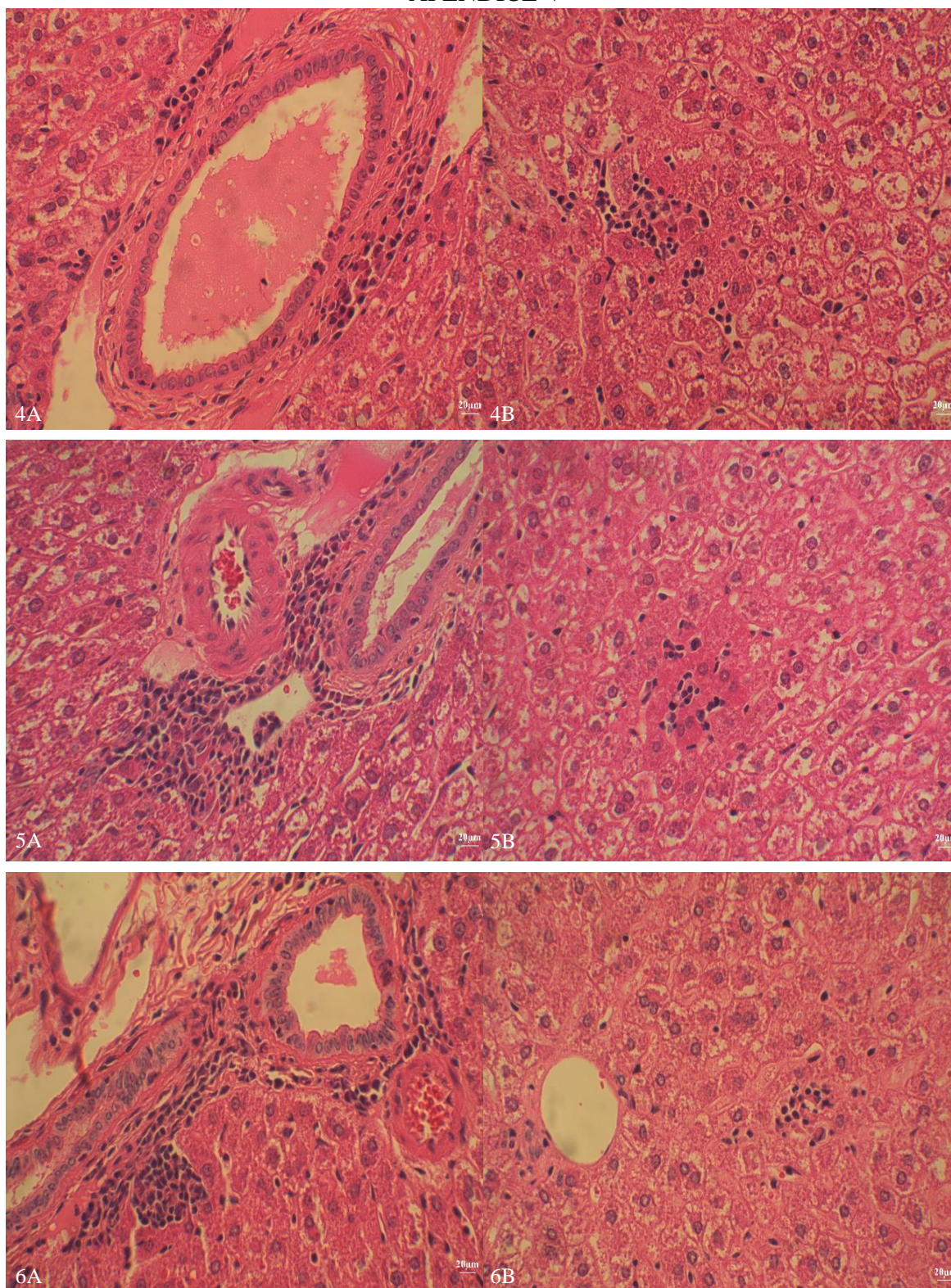
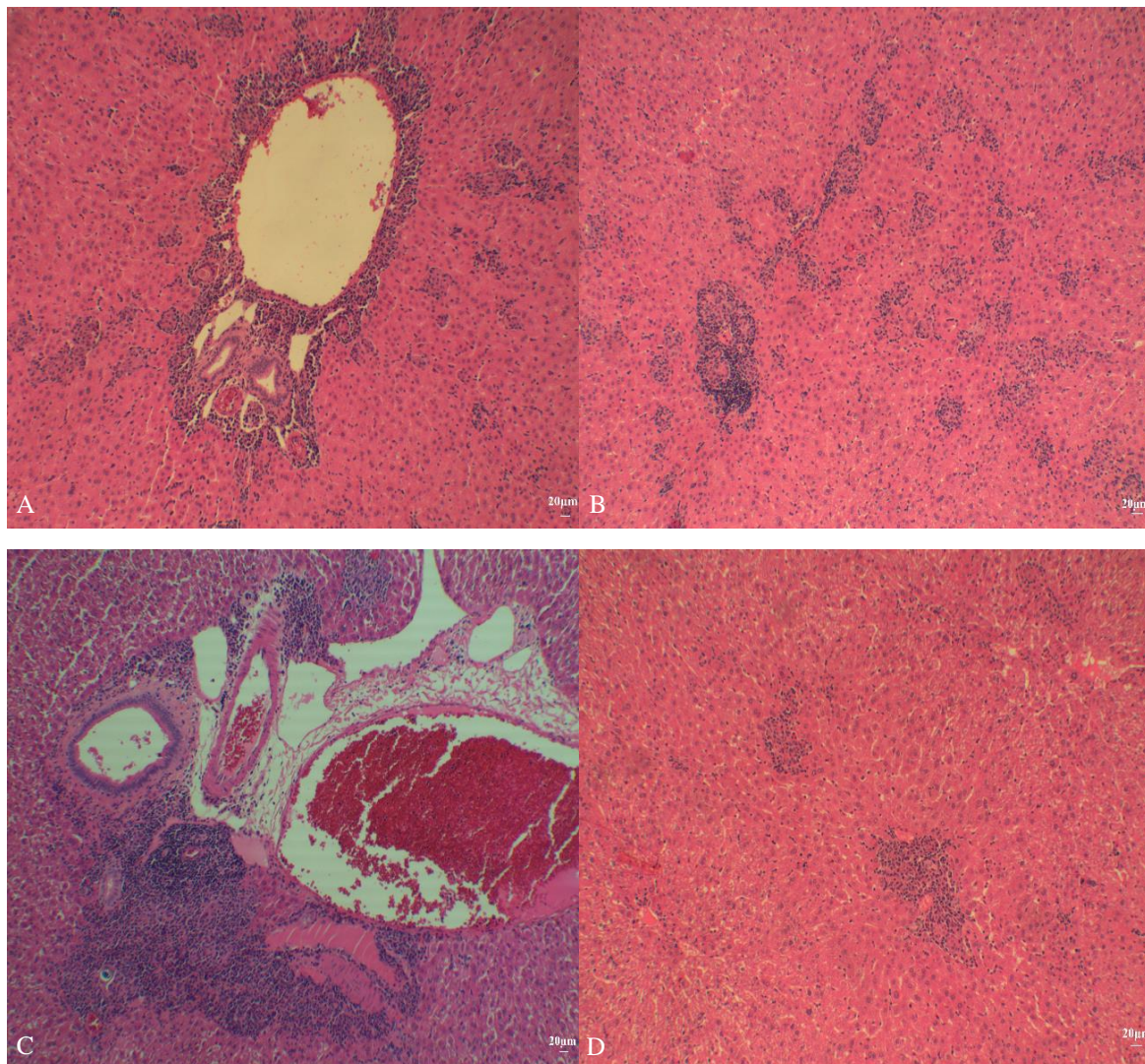


Figura 48 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A) Espaço porta, grupo tratado com 50/50. (4B) Parenquima hepático, grupo tratado com 50/50. (5A) Espaço porta, grupo tratado com 25/75. (5B) Parenquima hepático, grupo tratado com 25/75. (6A) Espaço porta, grupo tratado com GE. (6B) Parenquima hepático, grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE W



NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE X

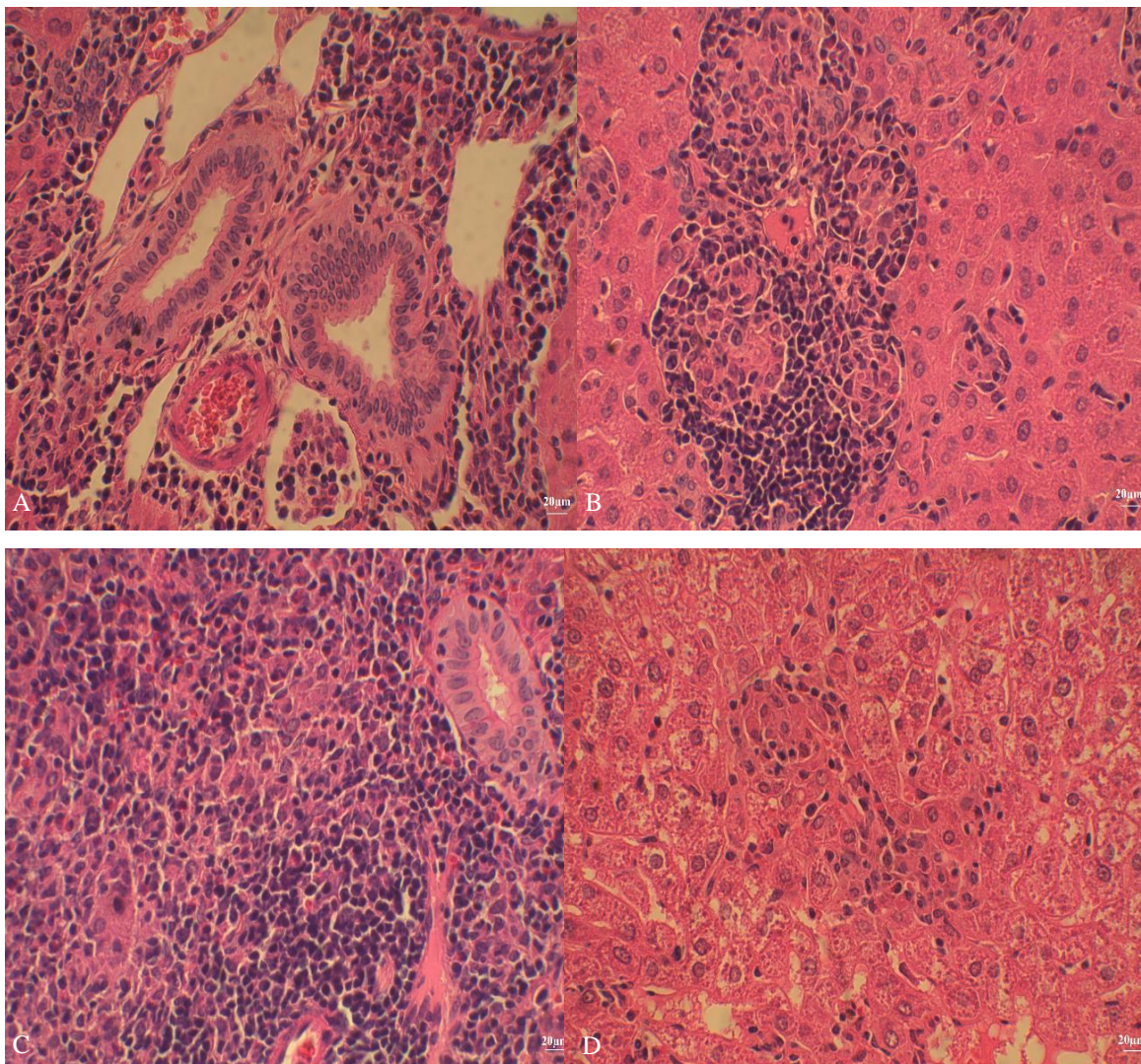


Figura 50 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters de grupos infectados não tratados. NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE Y

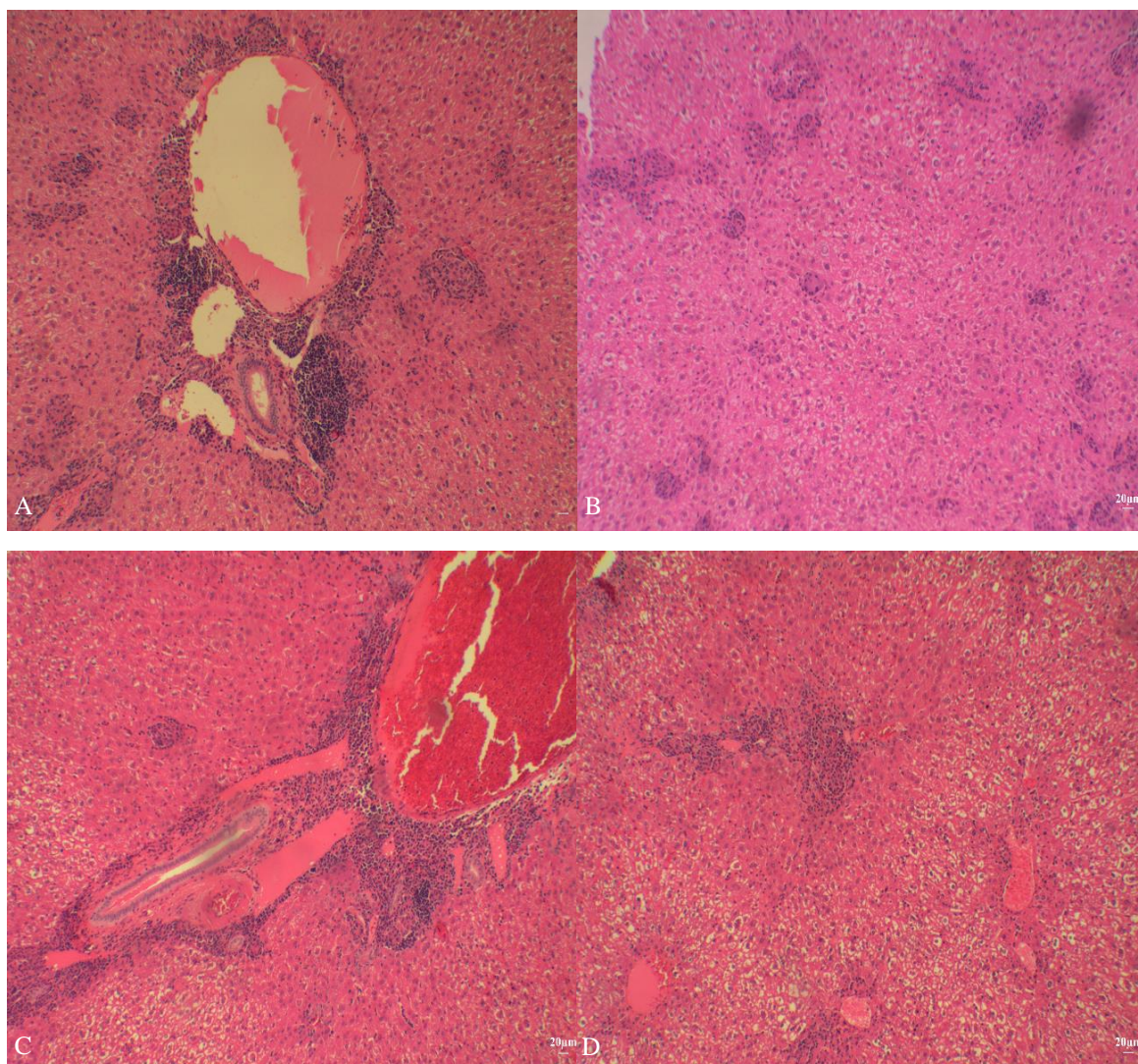


Figura 51 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com HDAB.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE Z

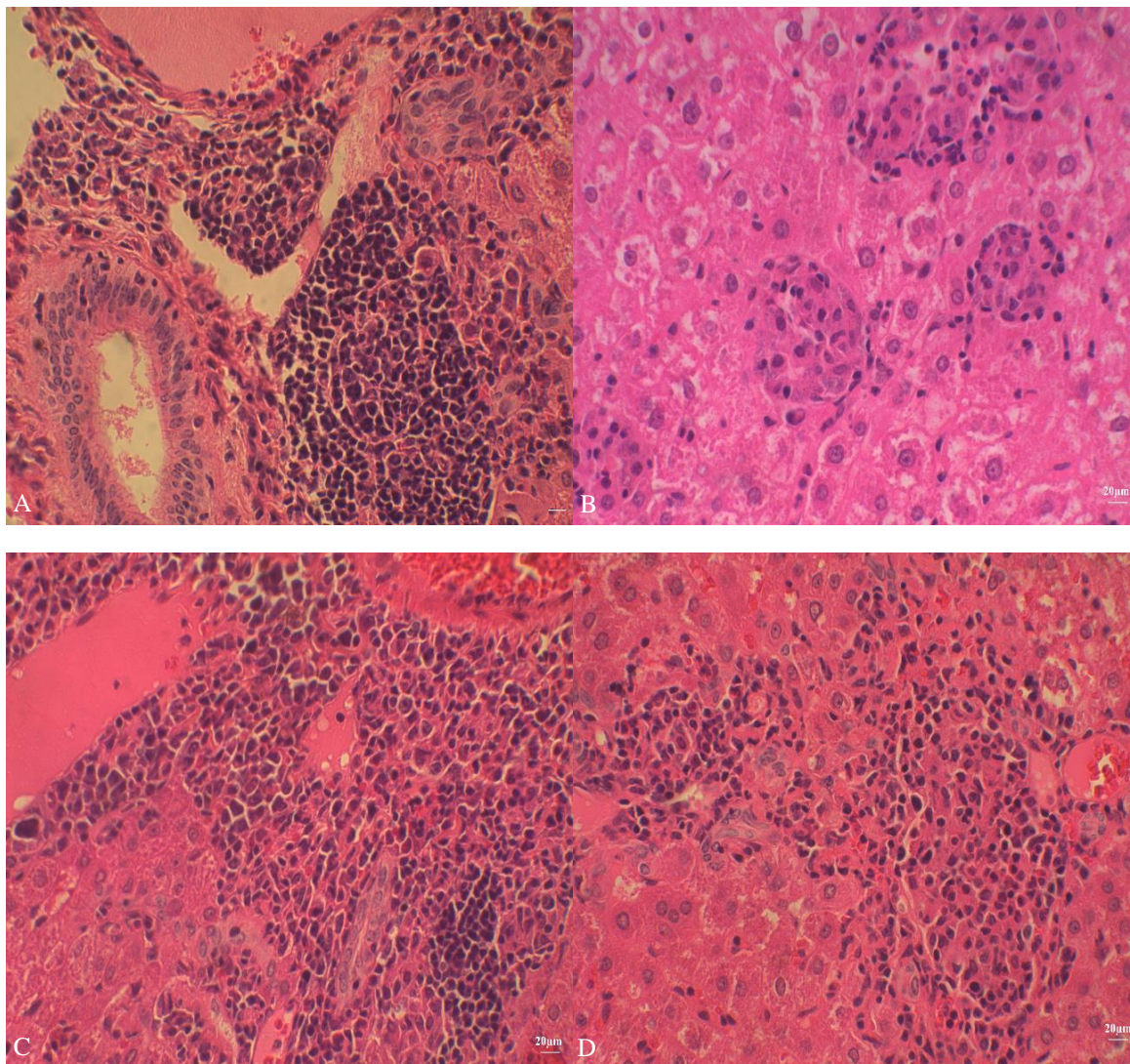


Figura 52 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com HDAB.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE AA

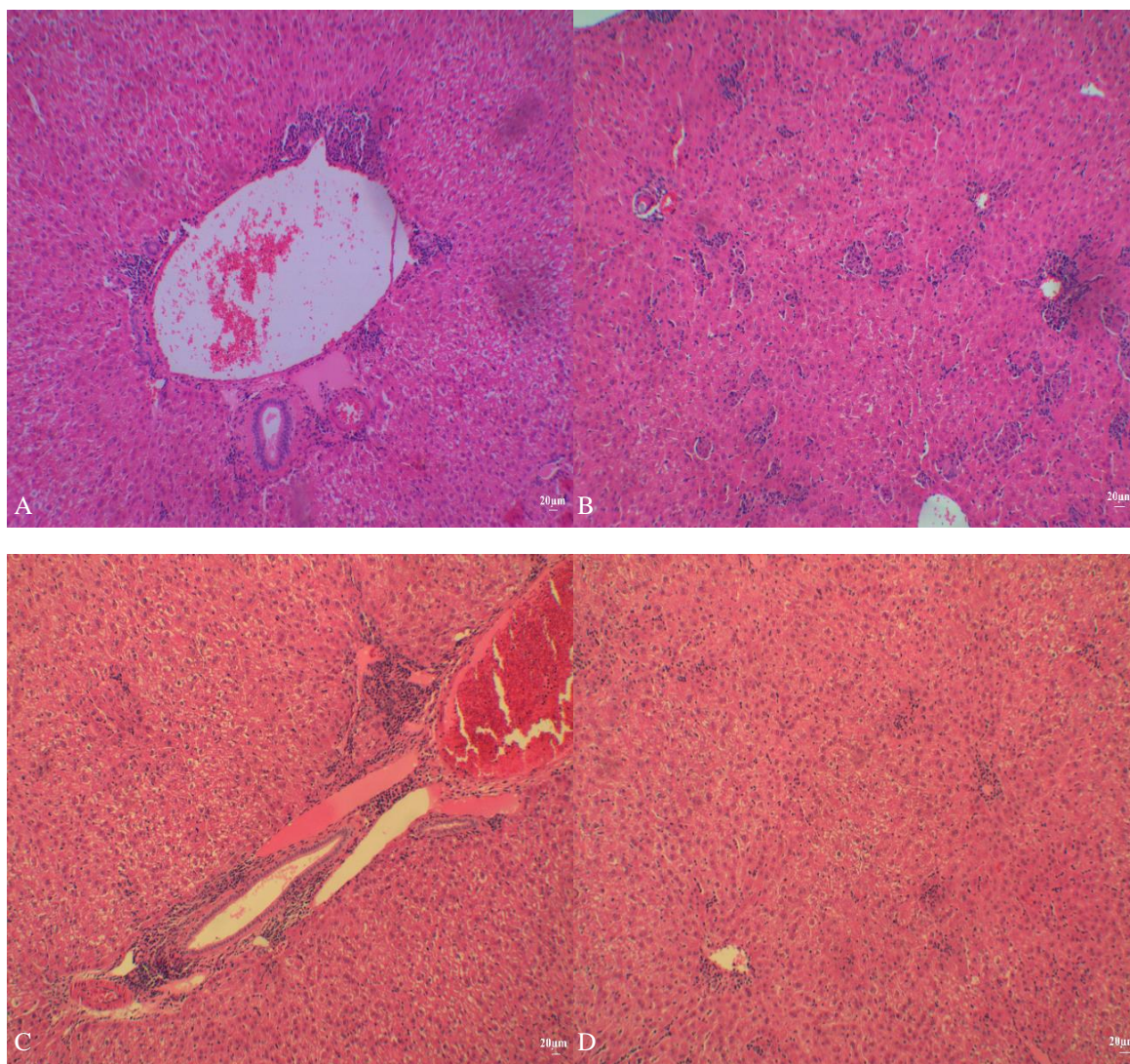


Figura 53 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 75/25.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE BB

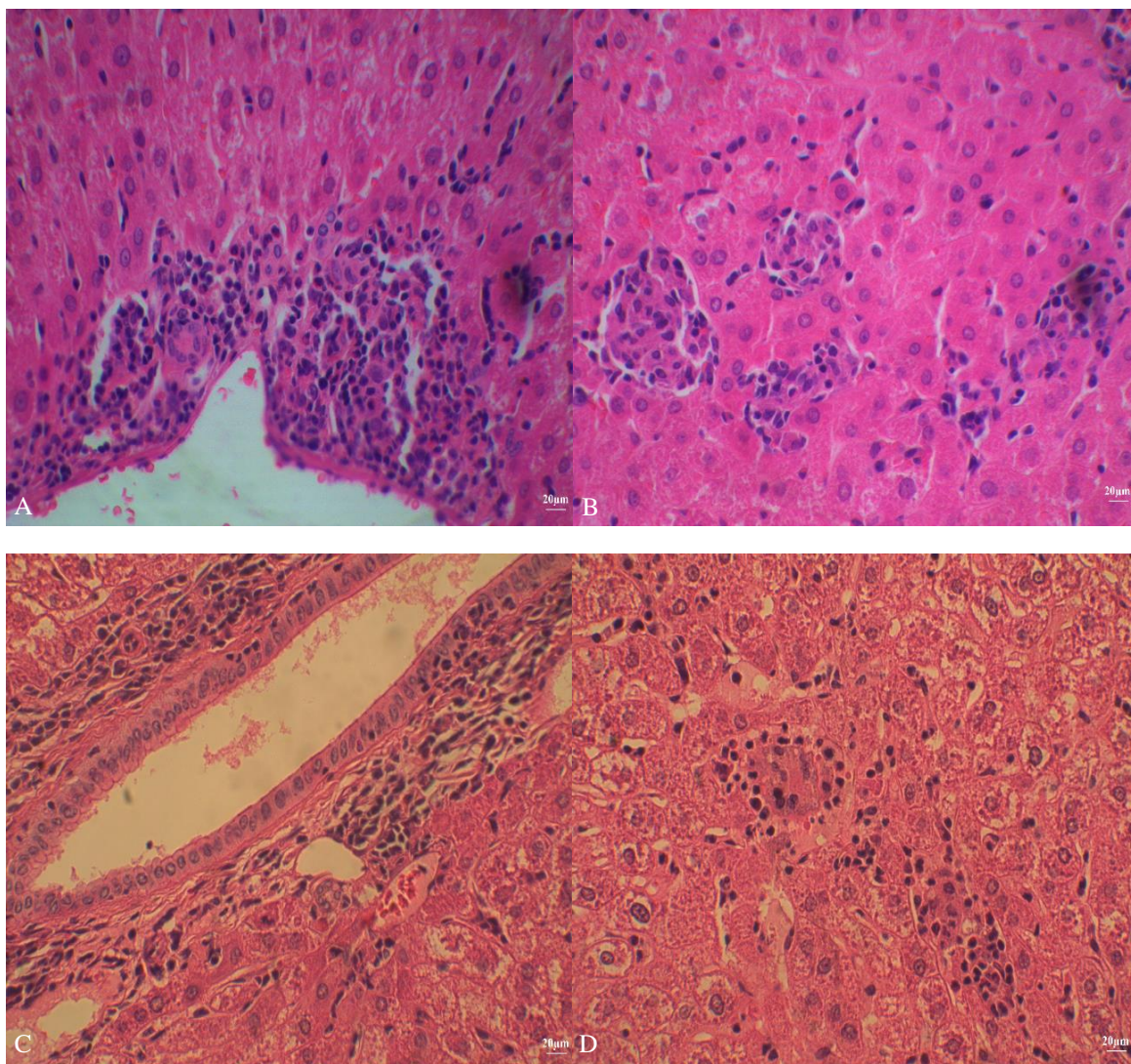


Figura 54 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 75/25.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE CC

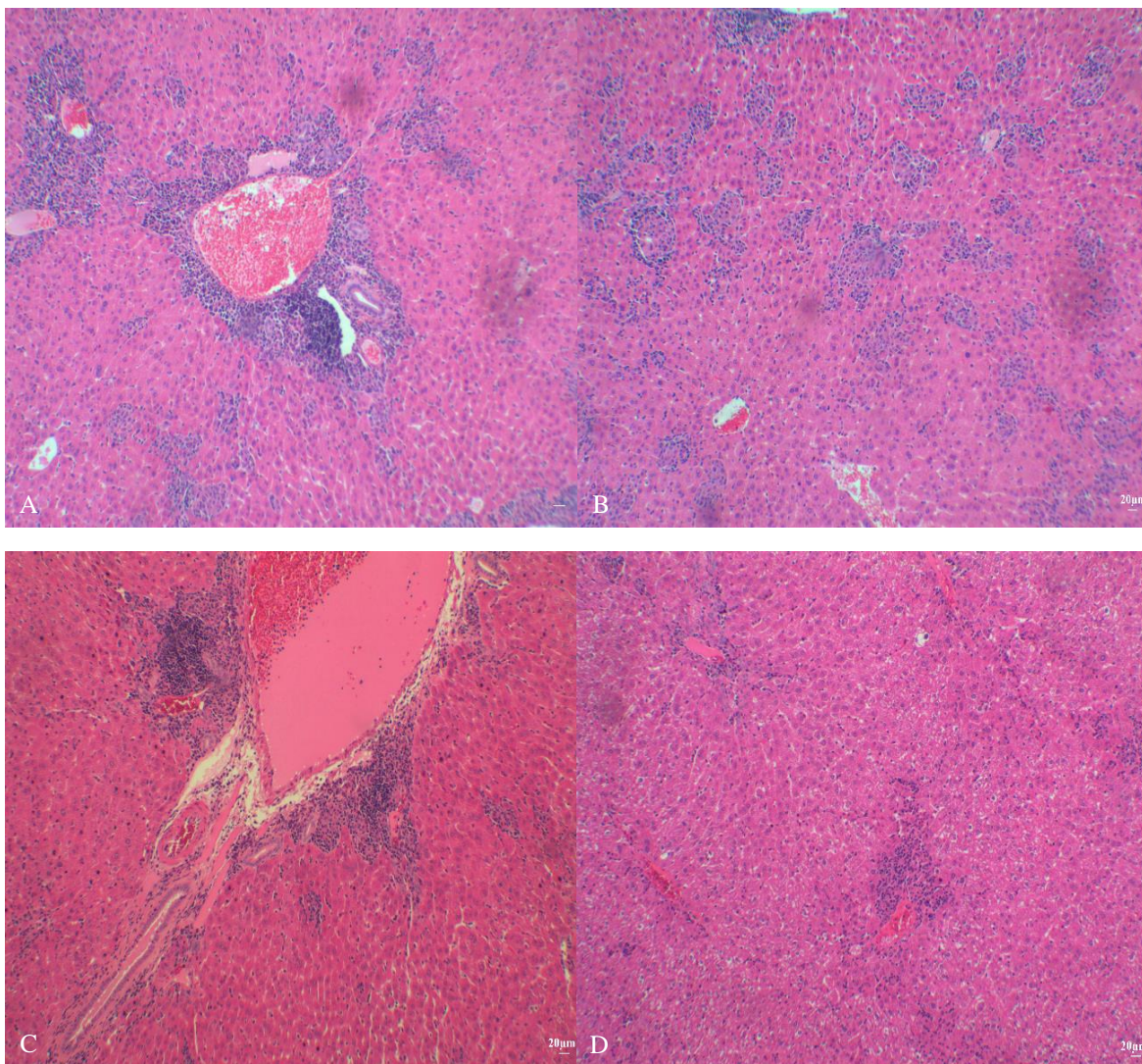


Figura 55 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 50/50.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE DD

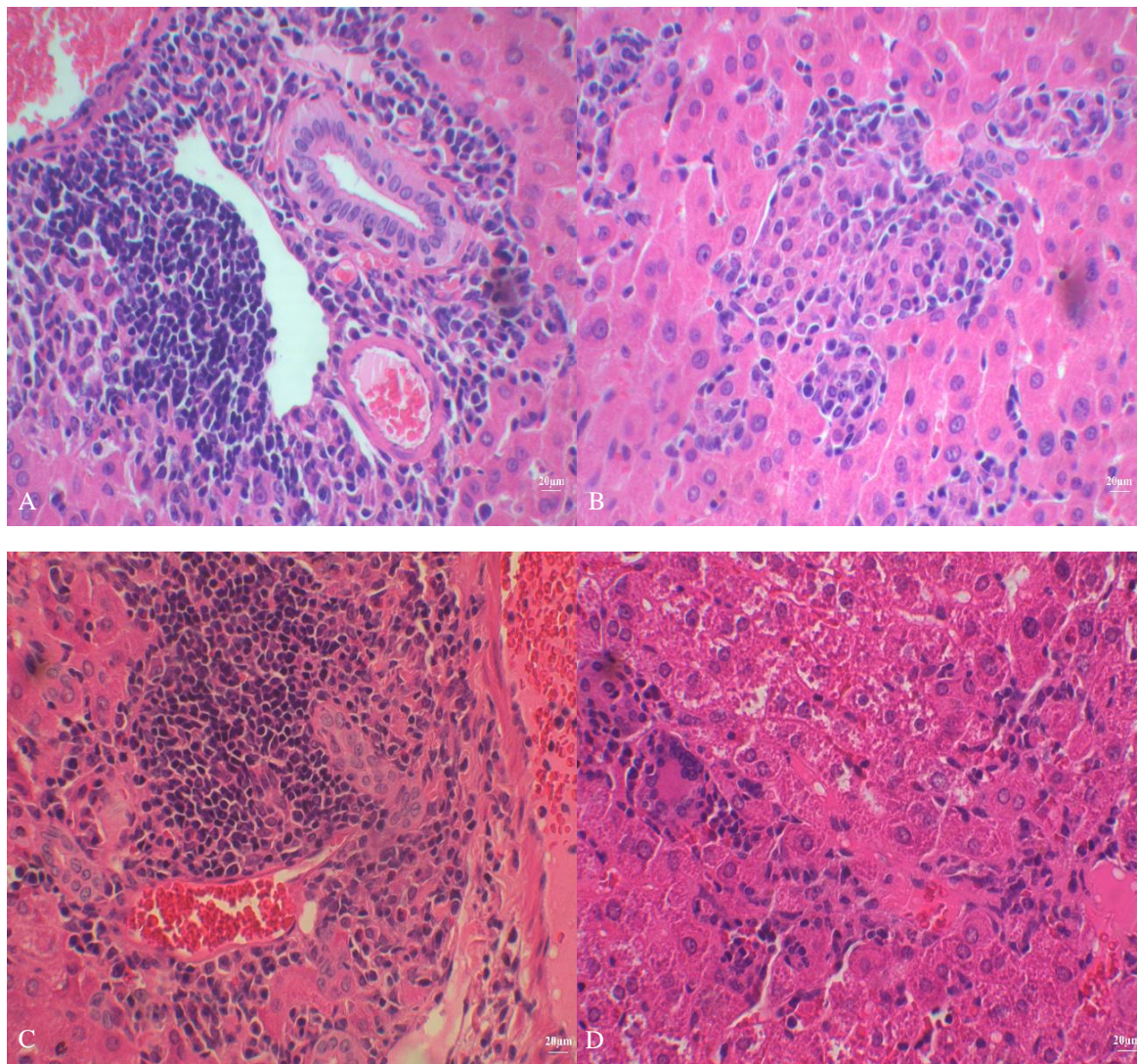


Figura 56 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 50/50.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE EE

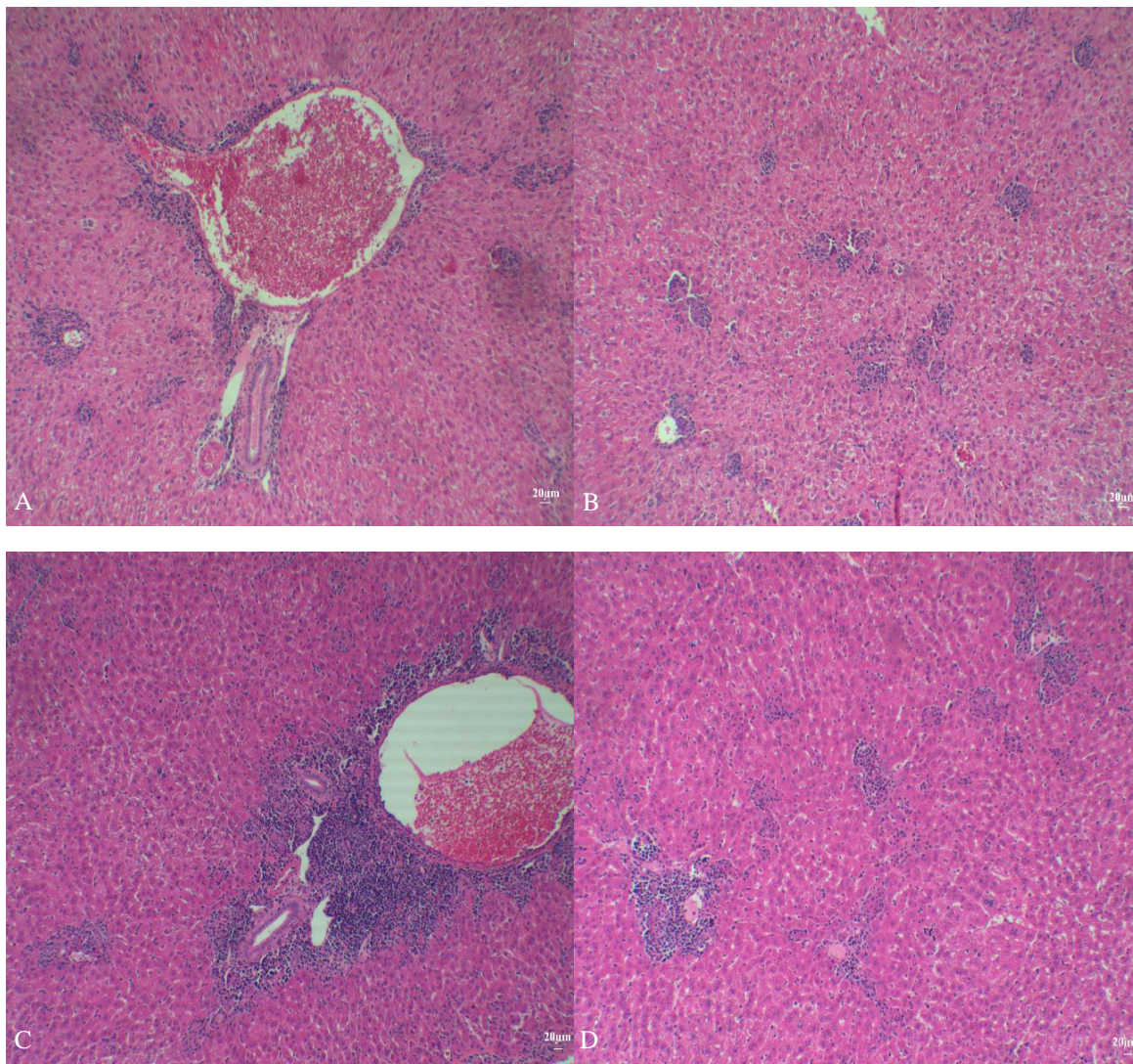


Figura 57 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 25/75.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE FF

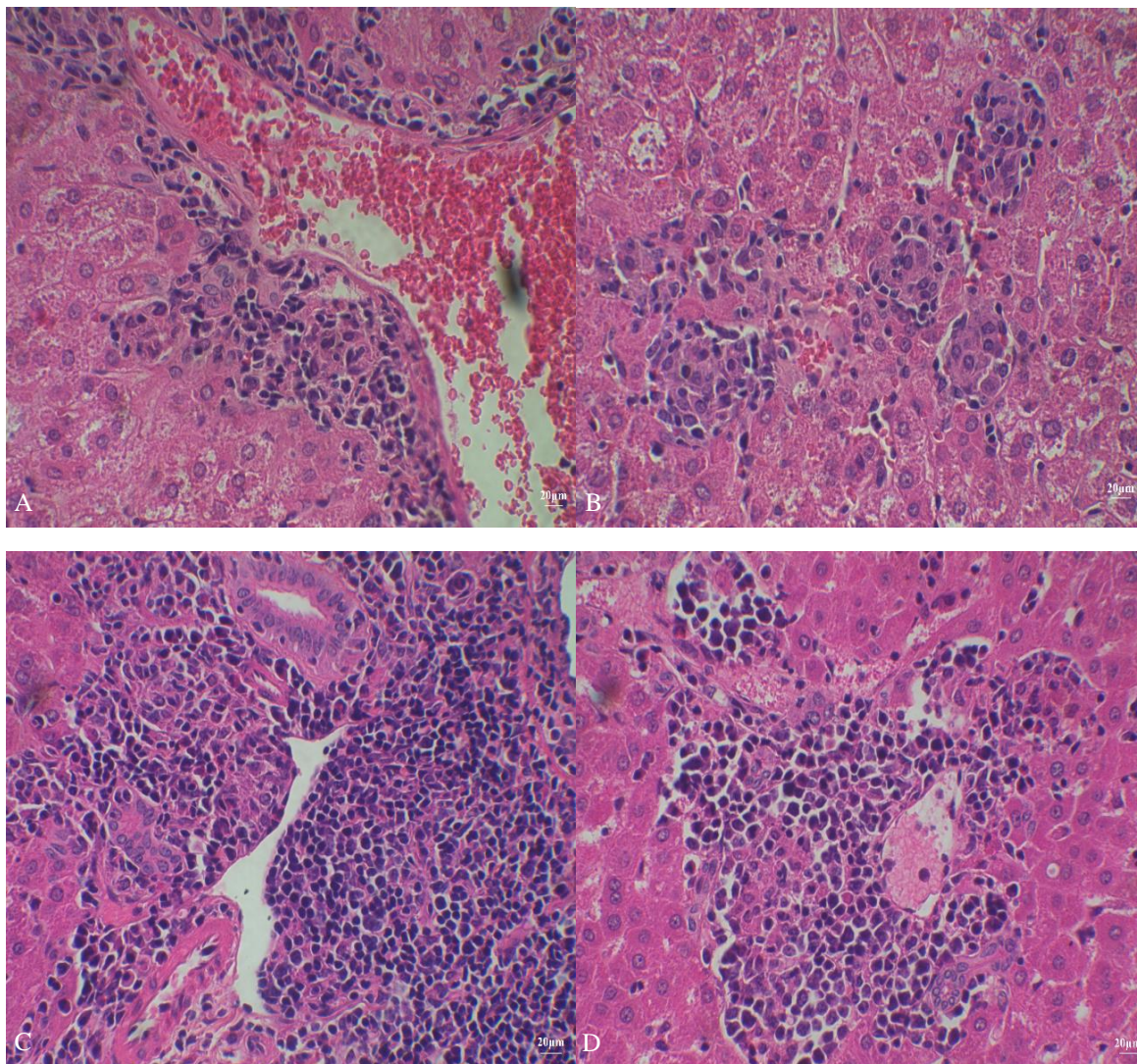


Figura 58 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com 25/75.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE GG

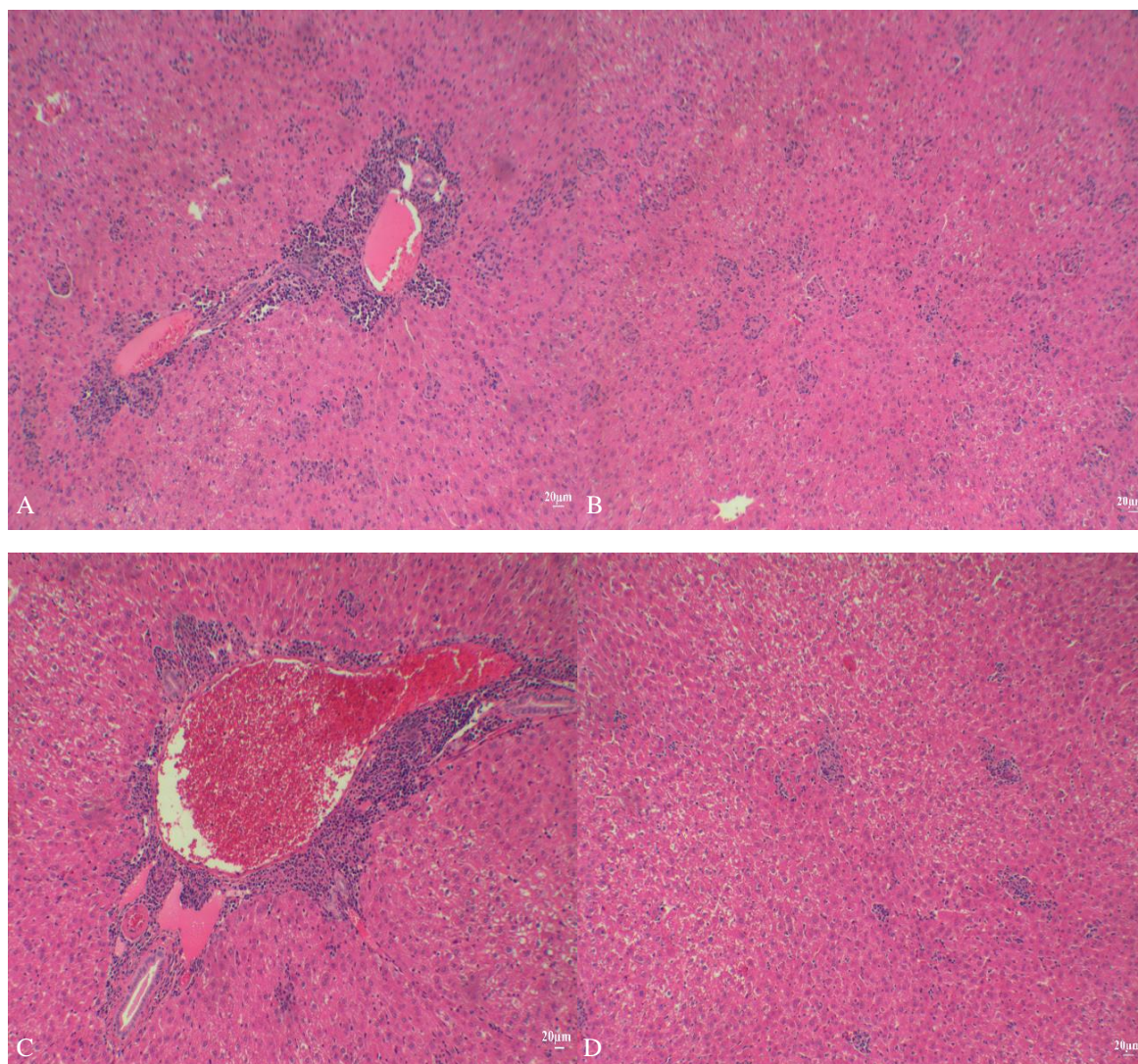


Figura 59 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com GE.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE HH

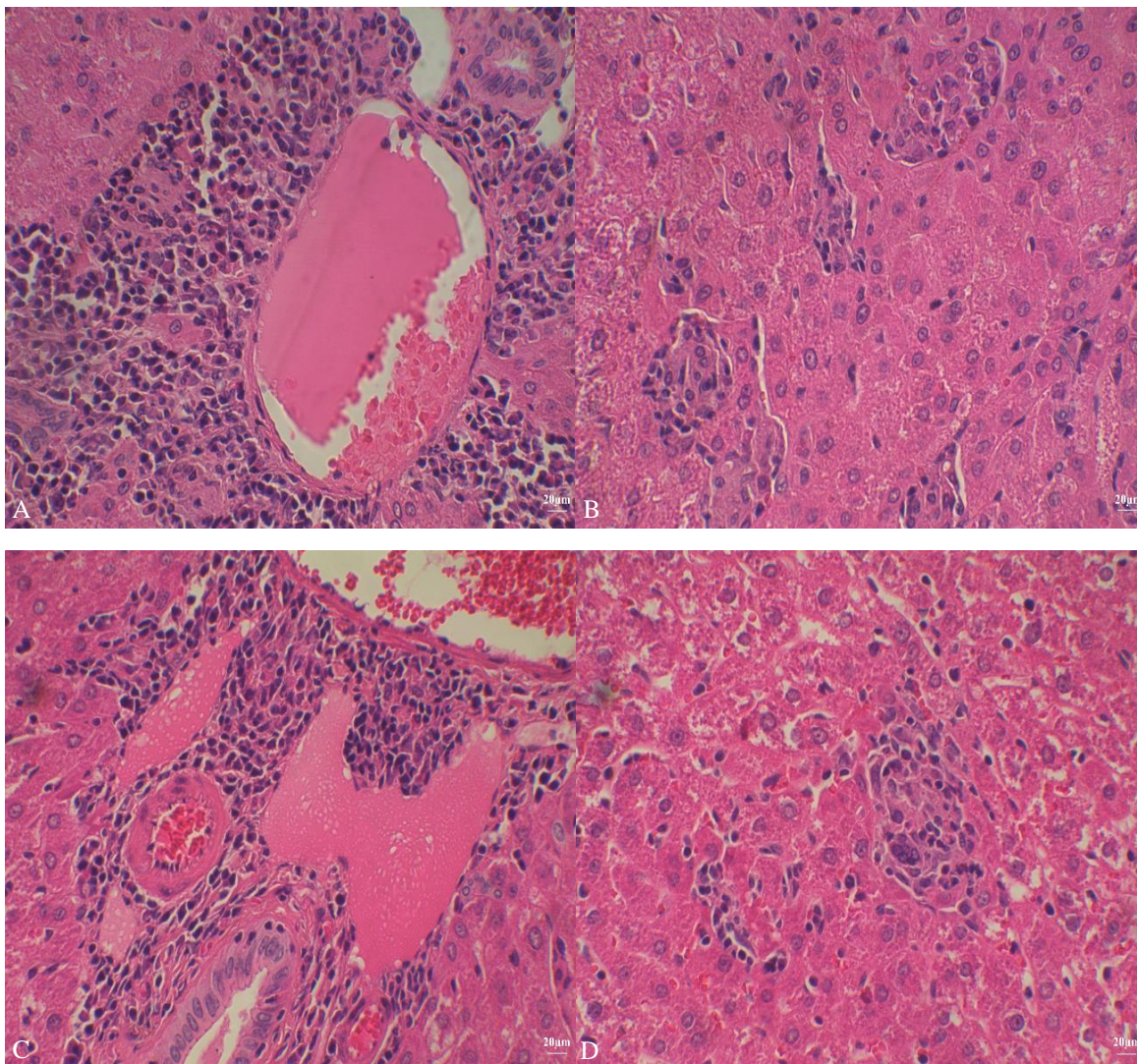


Figura 60 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com GE.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE II

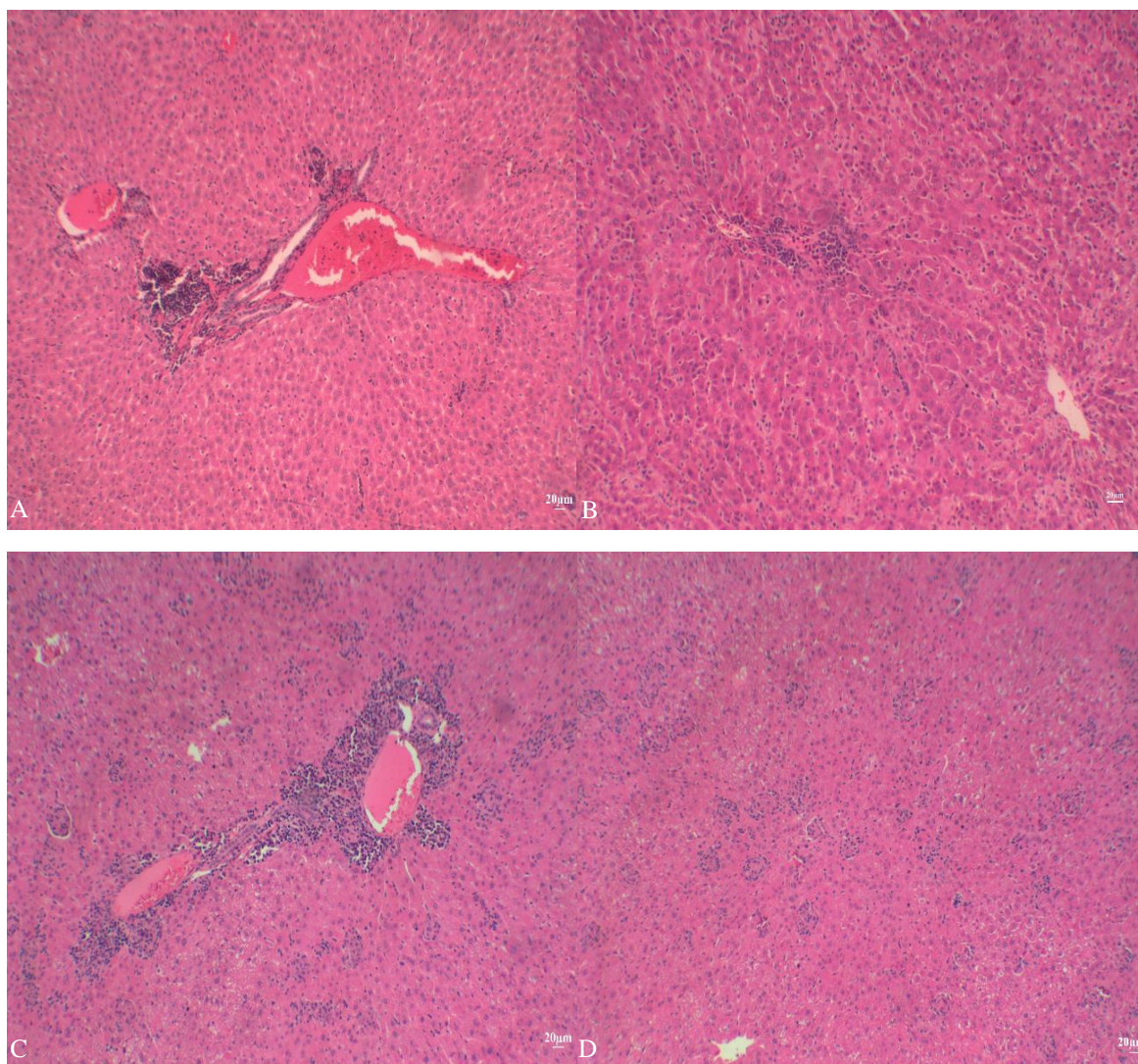


Figura 61 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com Glucantime®.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100x.

APÊNDICE JJ

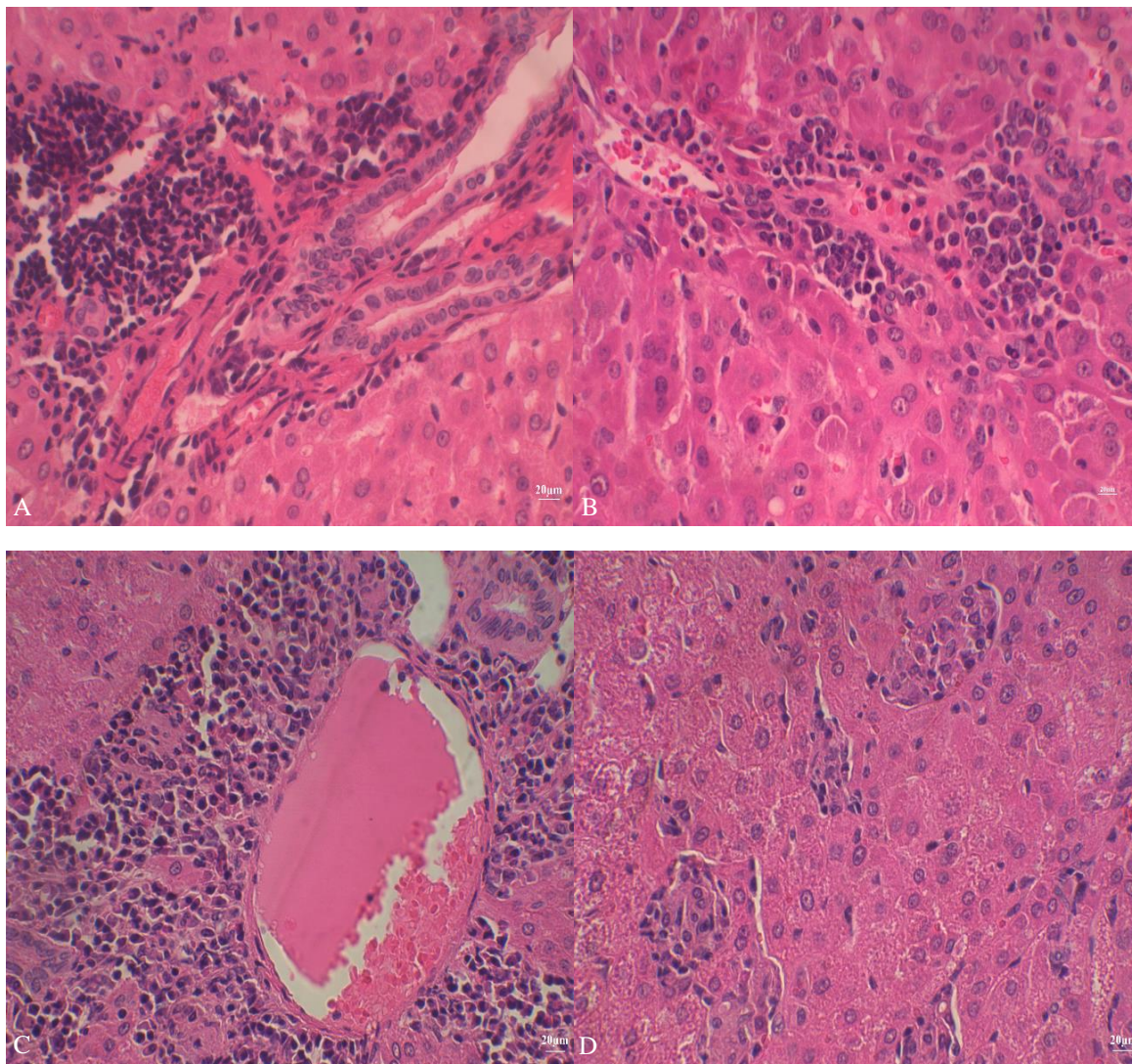


Figura 62- Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de hamsters infectados tratados com Glucantime®.

NOTA: (A) Espaço porta, grupo infectado com promastigotas. (B) Parenquima hepático, grupo infectado com promastigotas. (C) Espaço porta, grupo infectado com amastigotas. (D) Parenquima hepático, grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

APÊNDICE KK

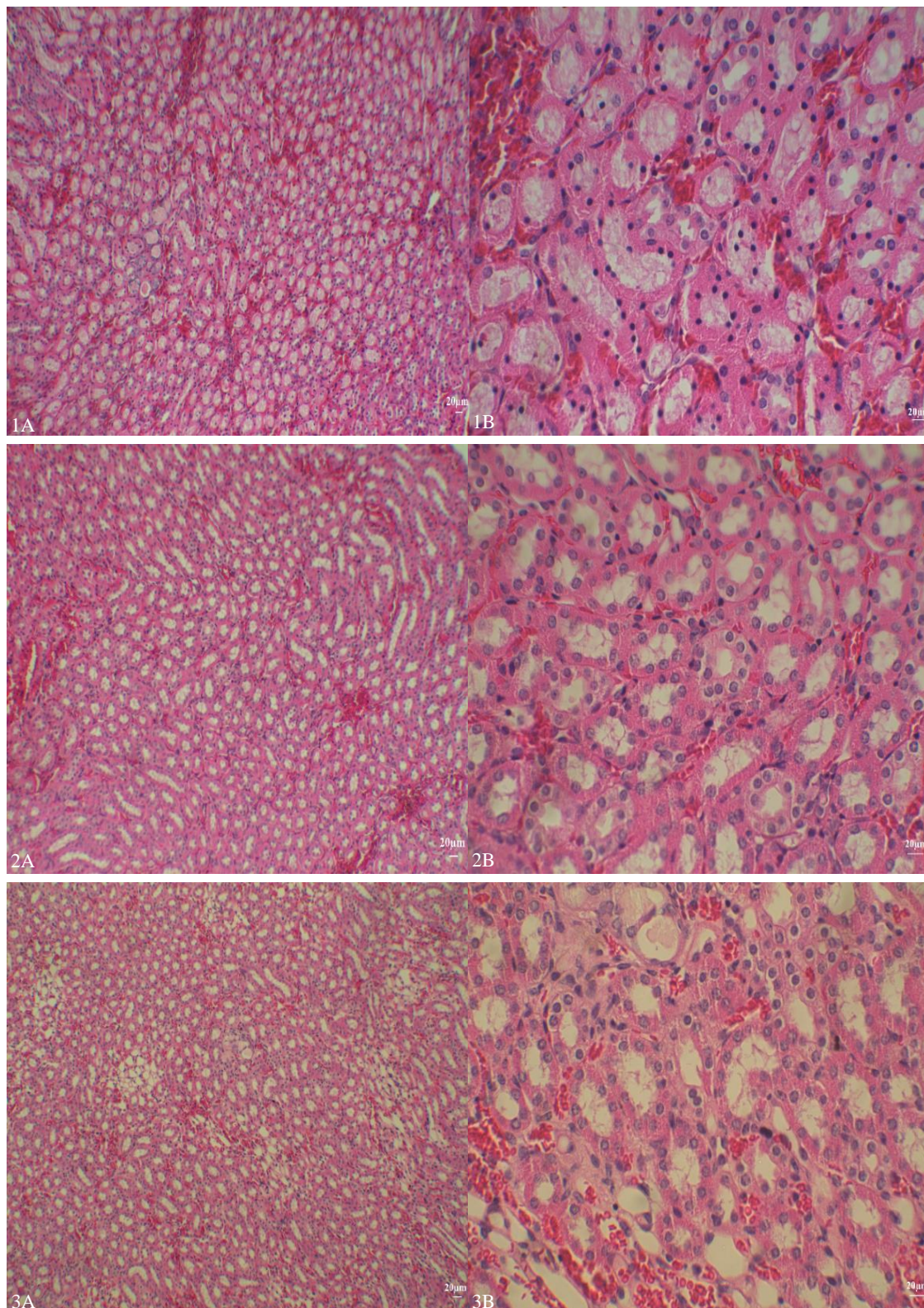


Figura 63 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A e 1B) Grupo controle. (2A e 2B) Grupo tratado com HDAB. (3A e 3B) Grupo tratado com HDAB 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x.

APÊNDICE II

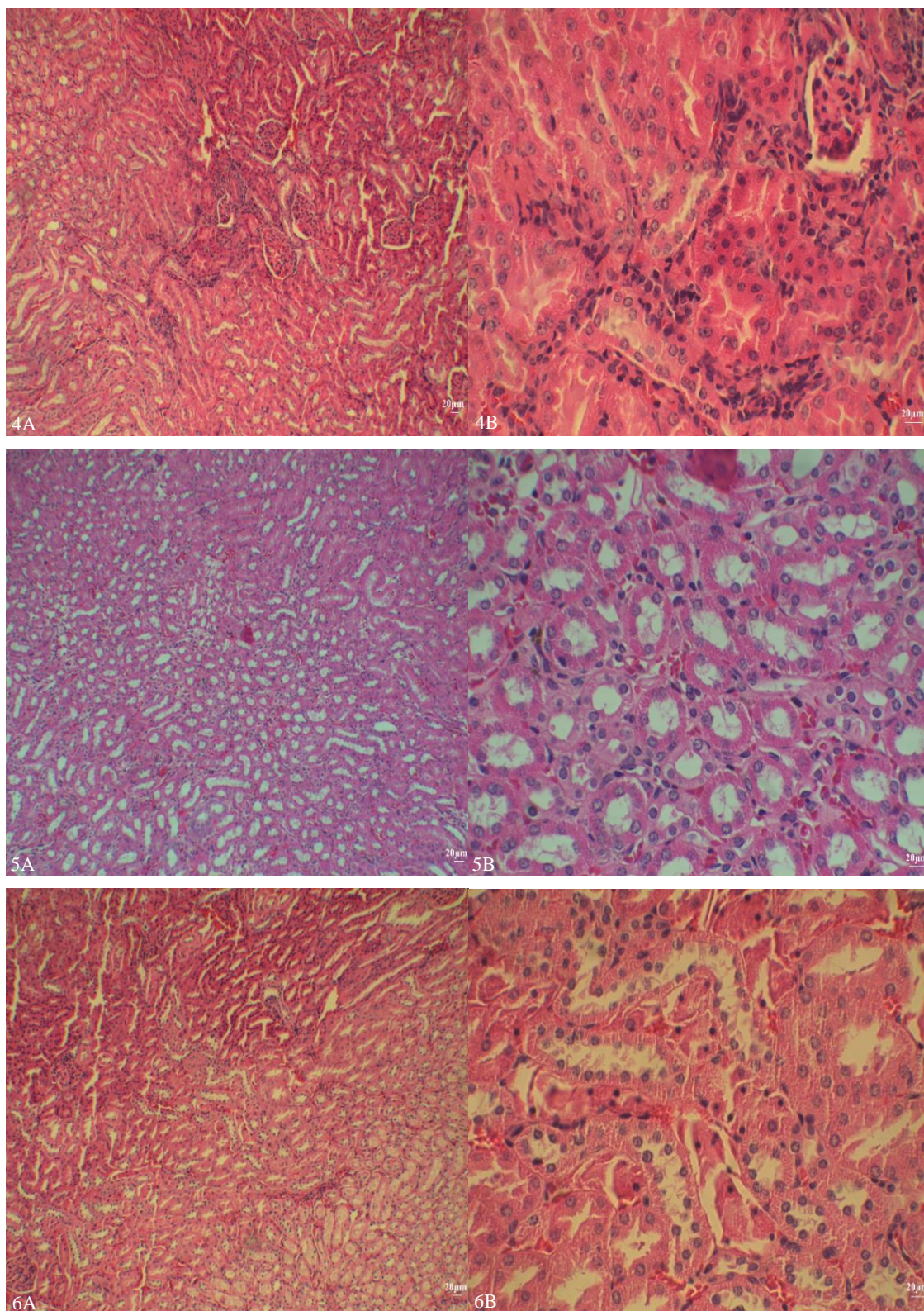


Figura 64 – Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A e 4B) Grupo tratado com 50/50. (5A e 5B) Grupo tratado com 25/75. (6A e 6B) Grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x

APÊNDICE MM

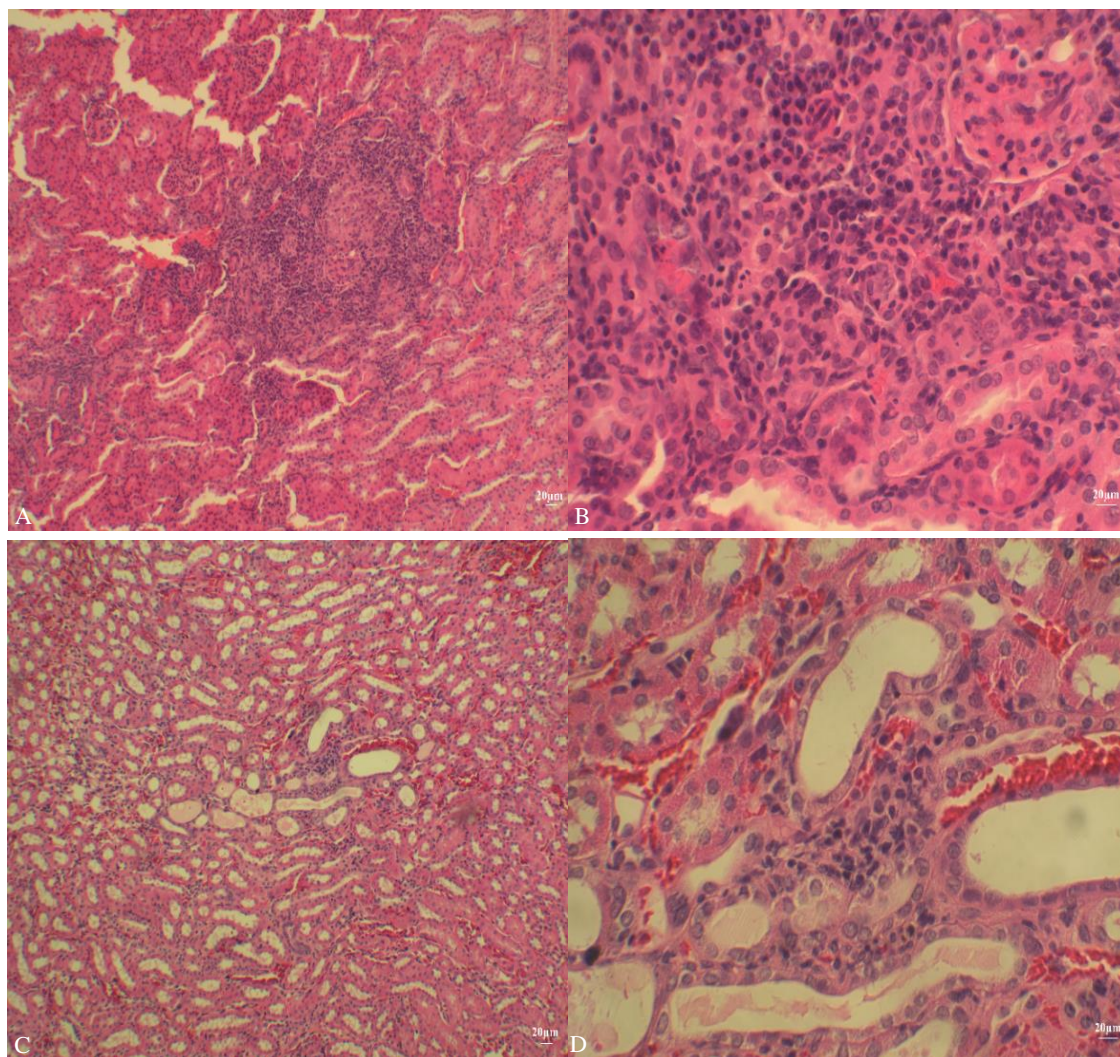


Figura -65 Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos infectados não tratados.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE NN

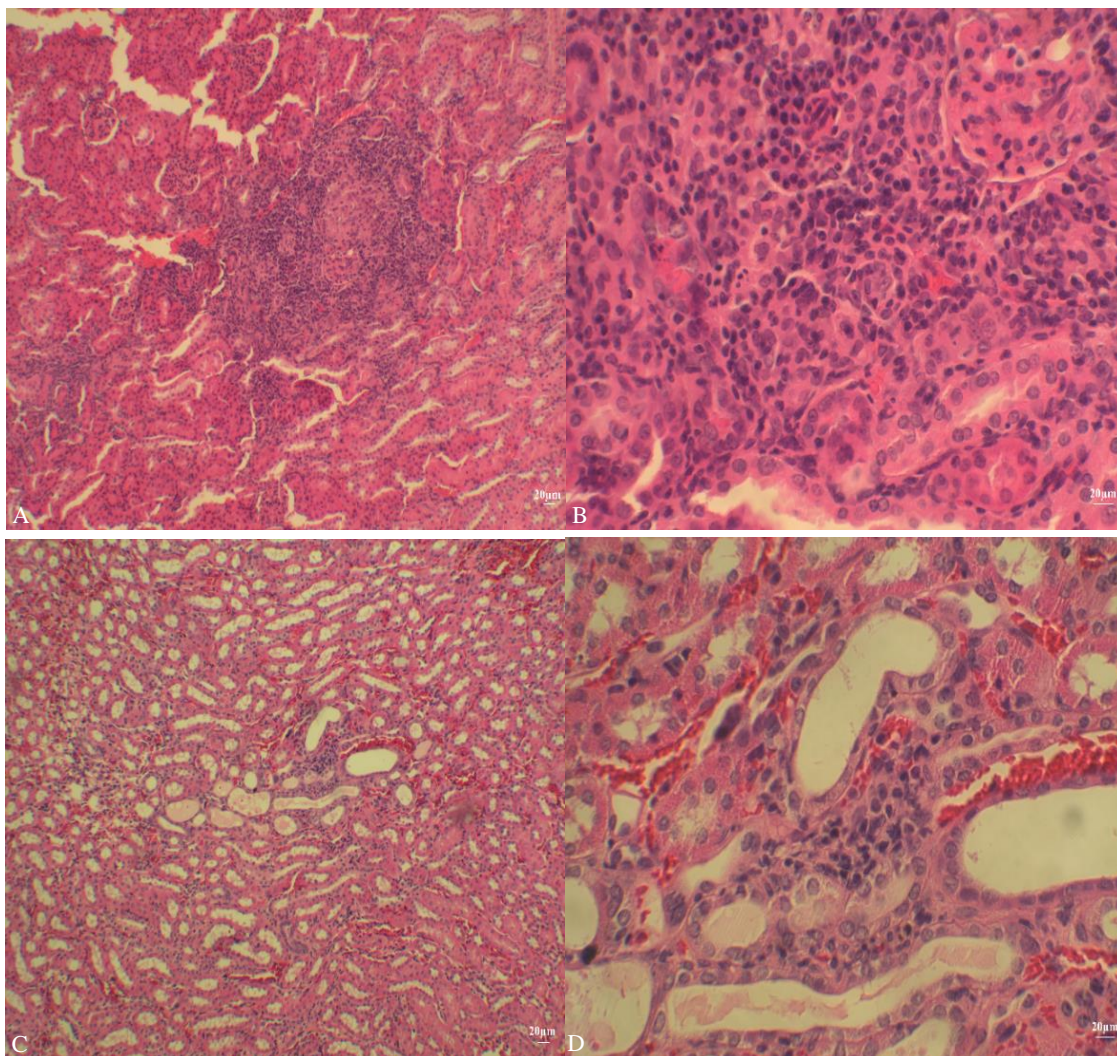


Figura 66 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com HDAB.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE OO

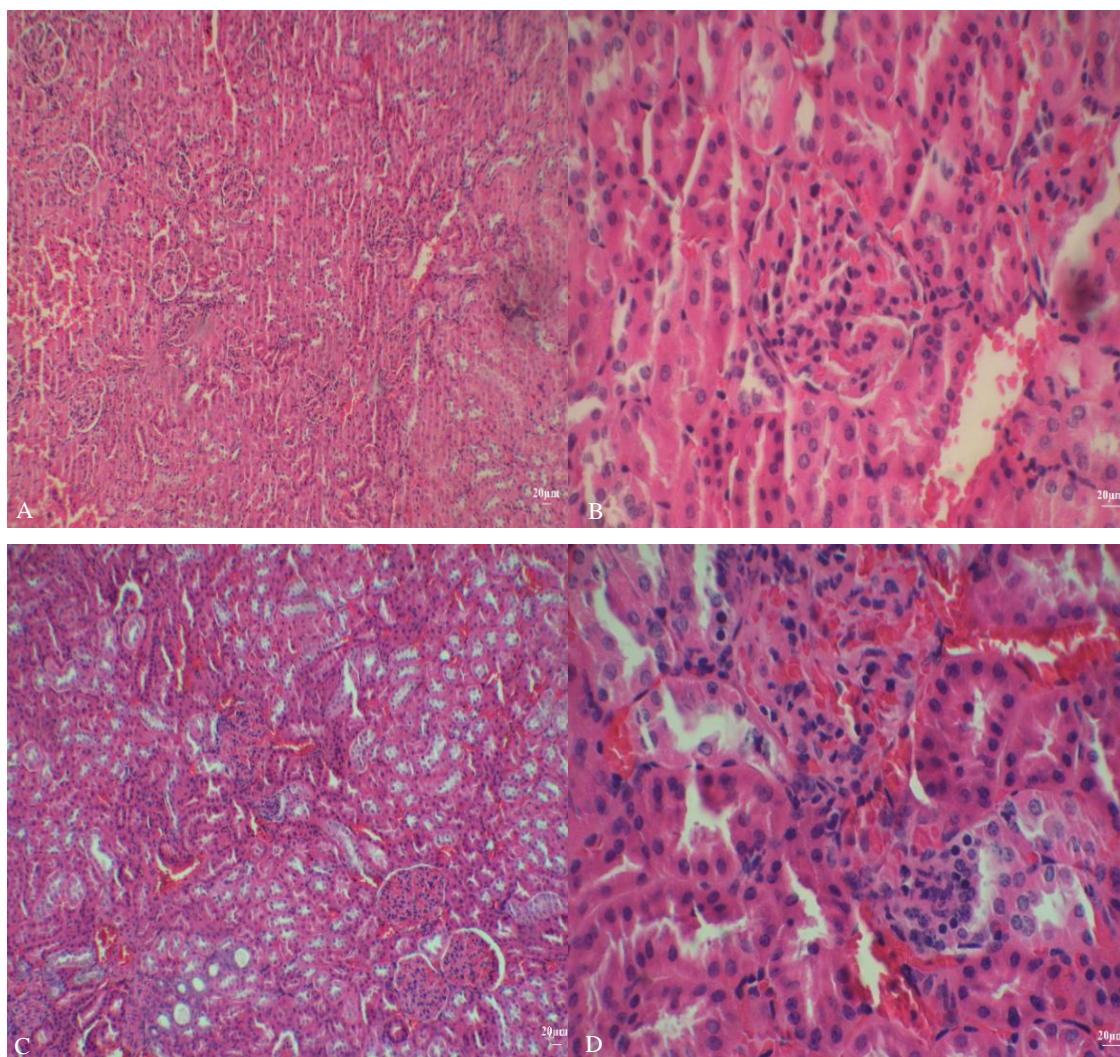


Figura 67 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com 75/25.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE PP

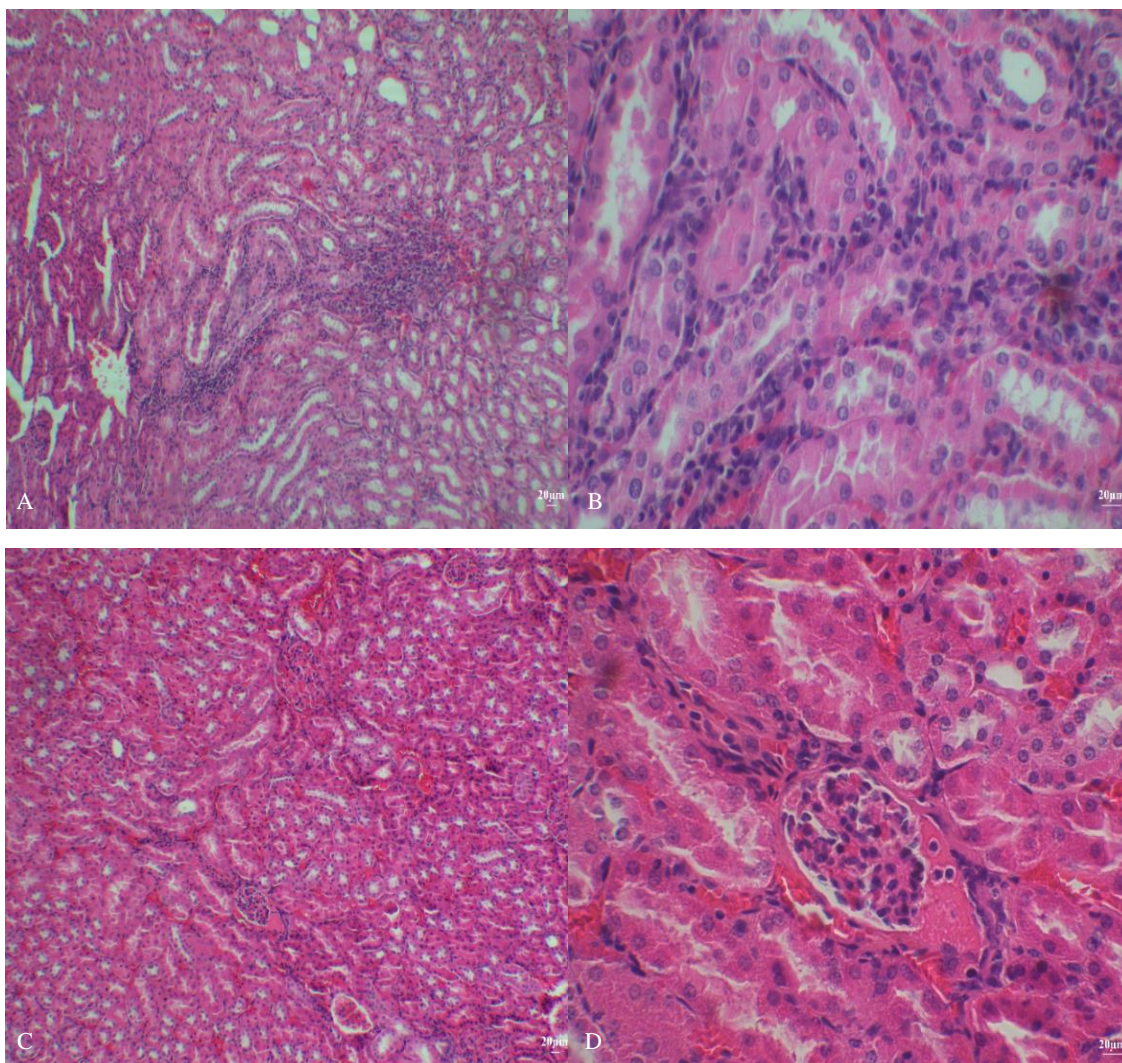


Figura 68 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com 50/50.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE QQ

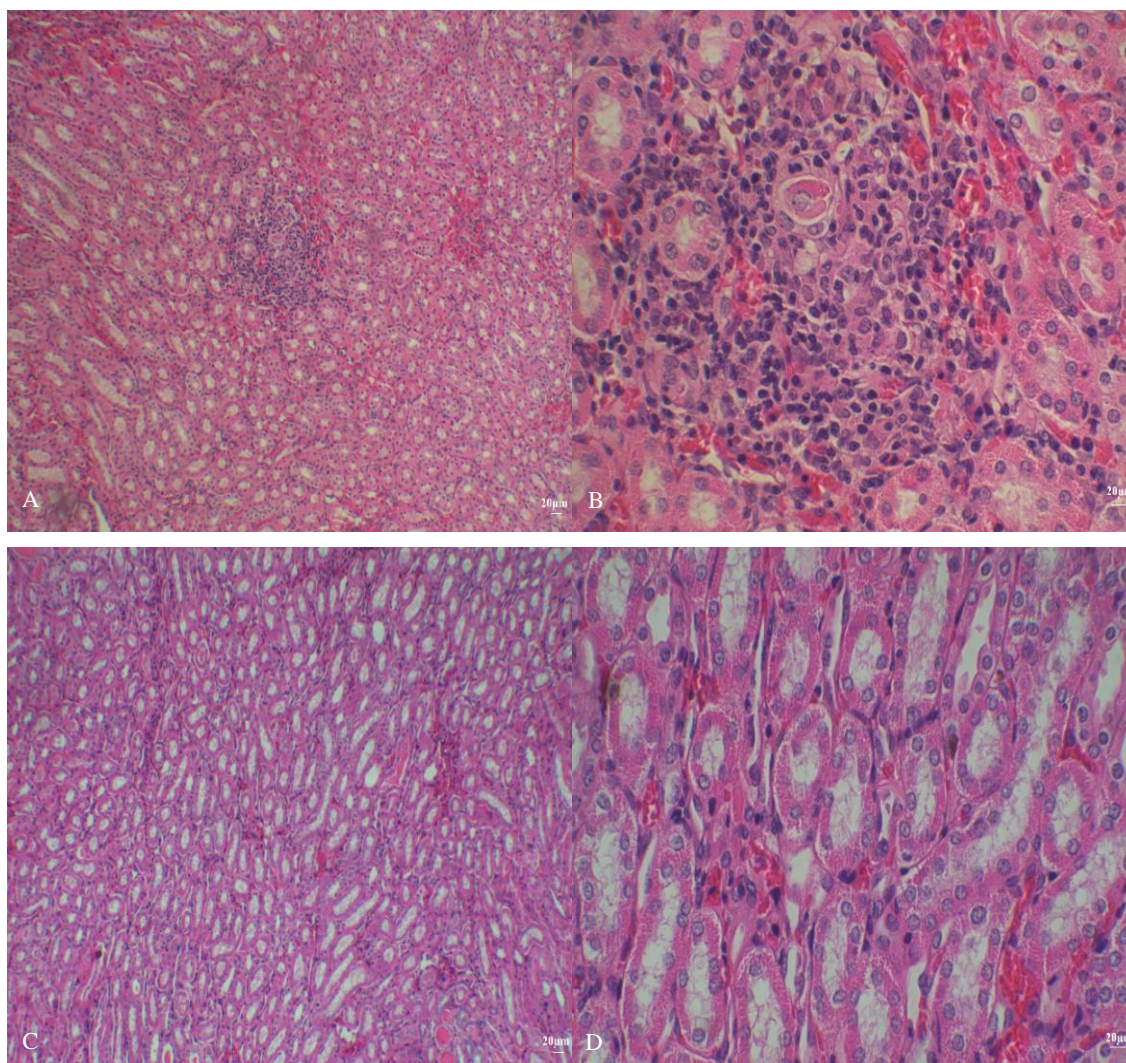


Figura 69 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com 25/75.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE RR

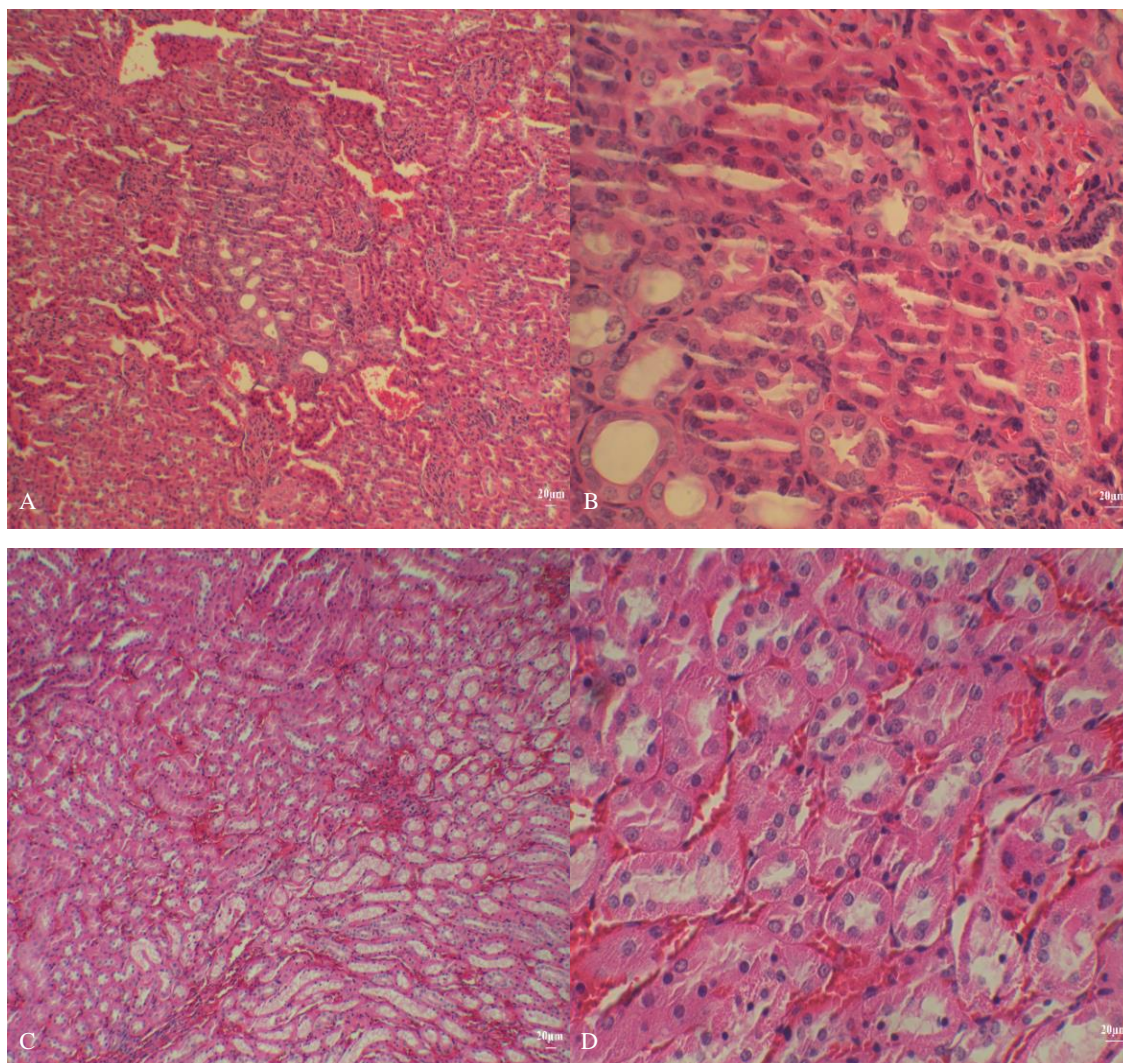


Figura 70 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com GE.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE SS

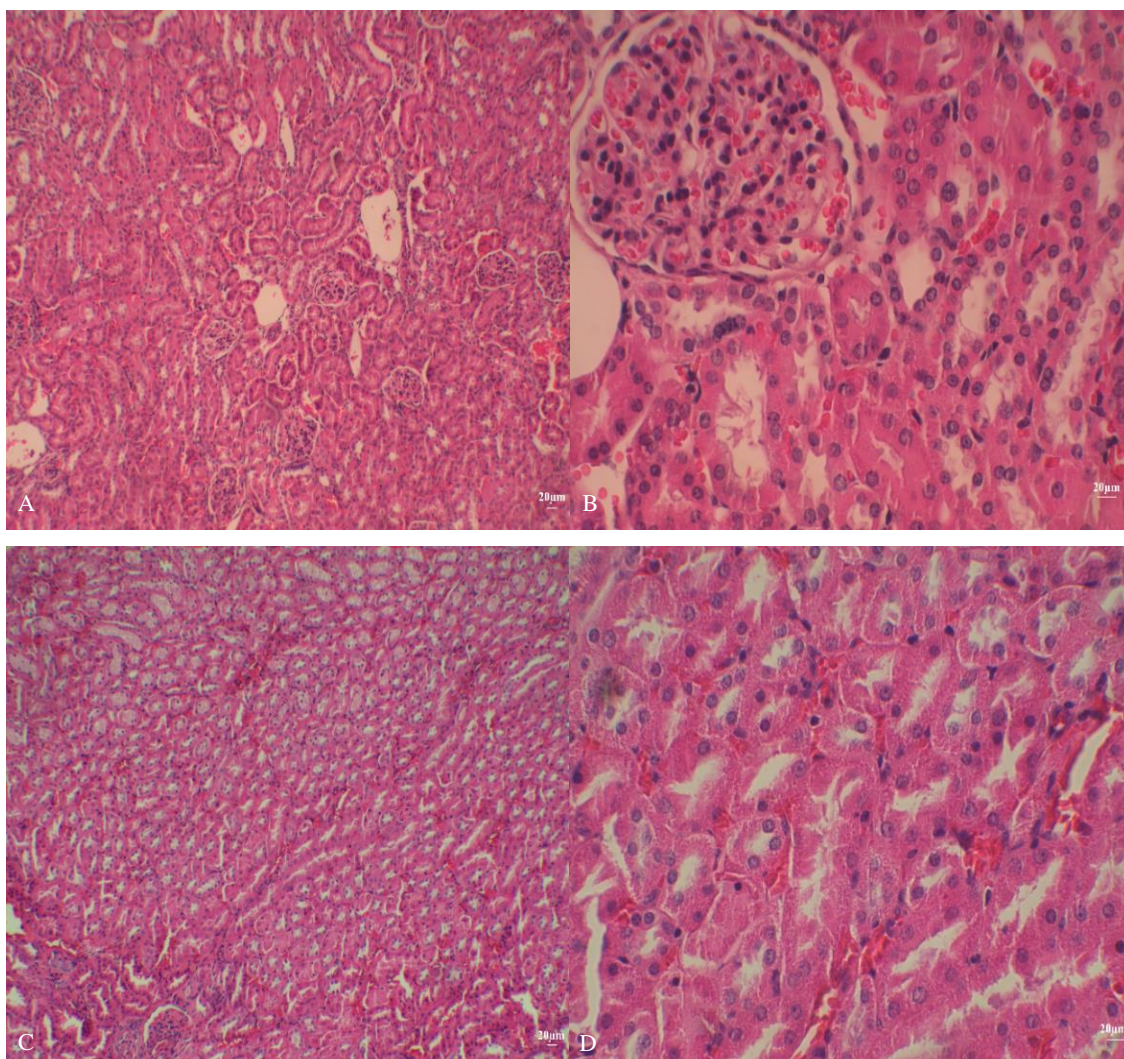


Figura 71 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de hamsters de grupos tratados com Glucantime.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE TT

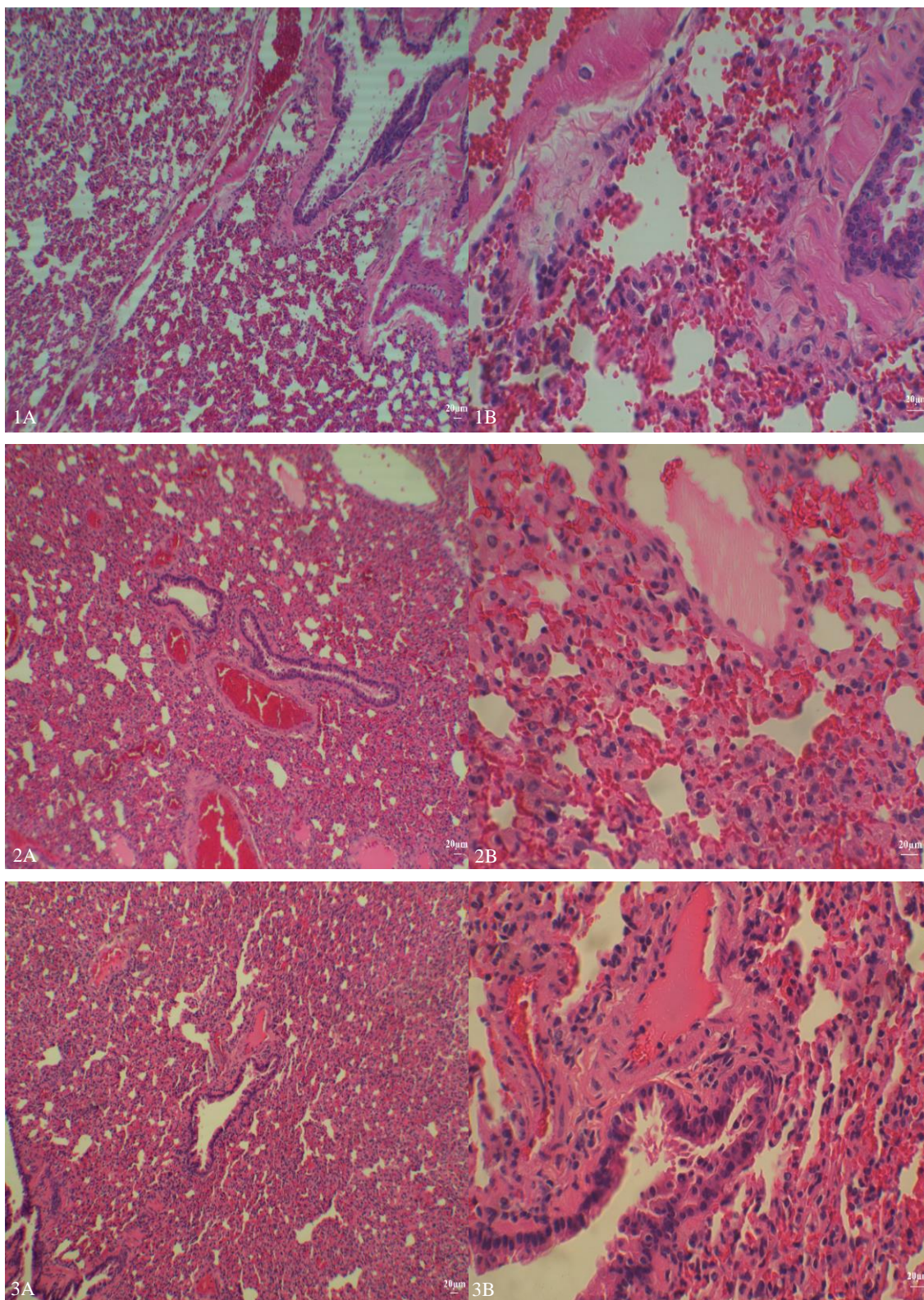


Figura 72 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A e 1B) Grupo controle. (2A e 2B) Grupo tratado com HDAB. (3A e 3B) Grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x.

APÊNDICE UU

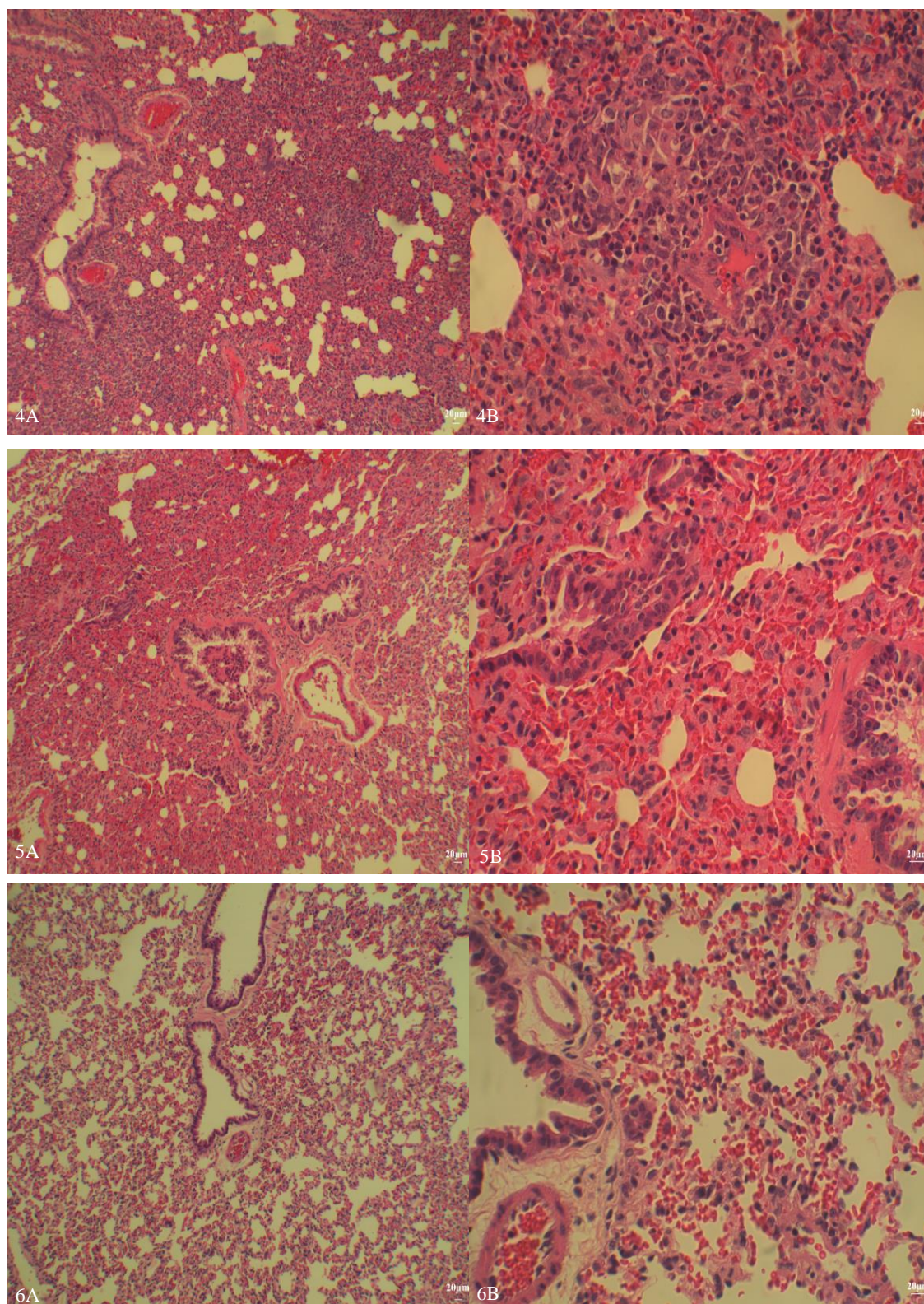


Figura 73 – Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A e 4B) Grupo tratado com 50/50. (5A e 5B) Grupo tratado com 25/75. (6A e 6B) Grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x.

APÊNDICE VV

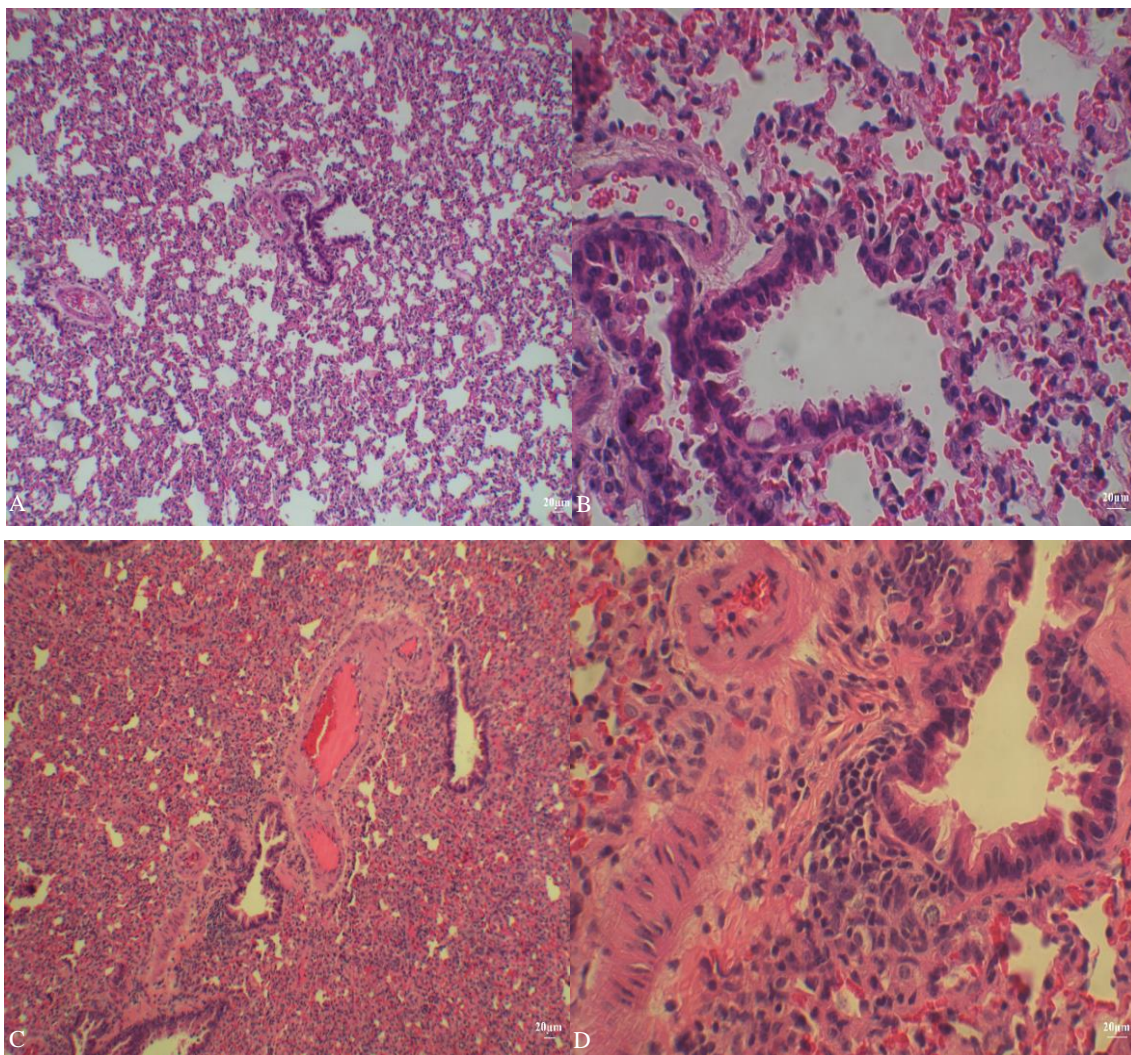


Figura 74 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos infectados não tratados.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE WW

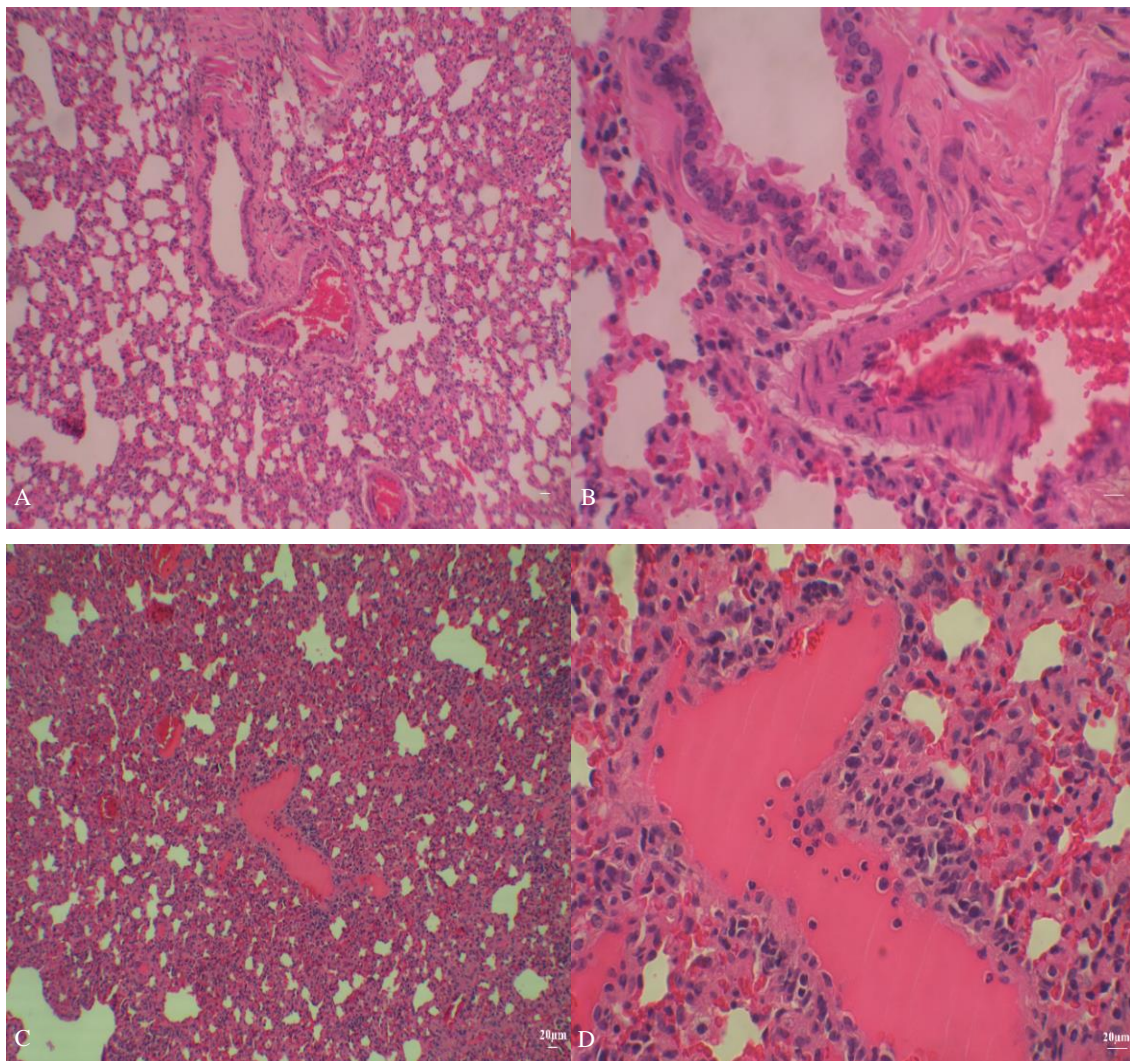


Figura 75 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com HDAB.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE XX

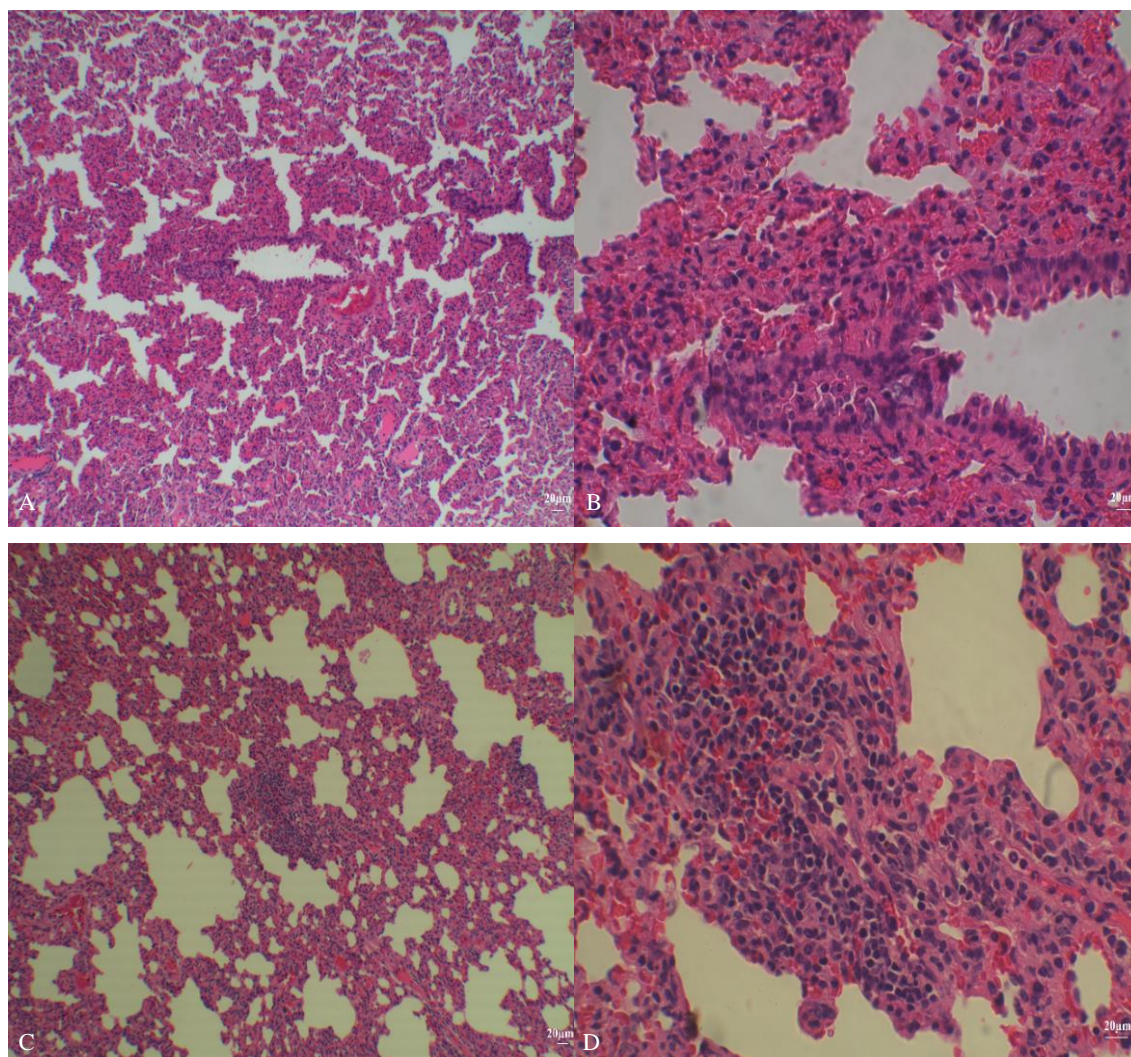


Figura 76 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com 75/25.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE YY

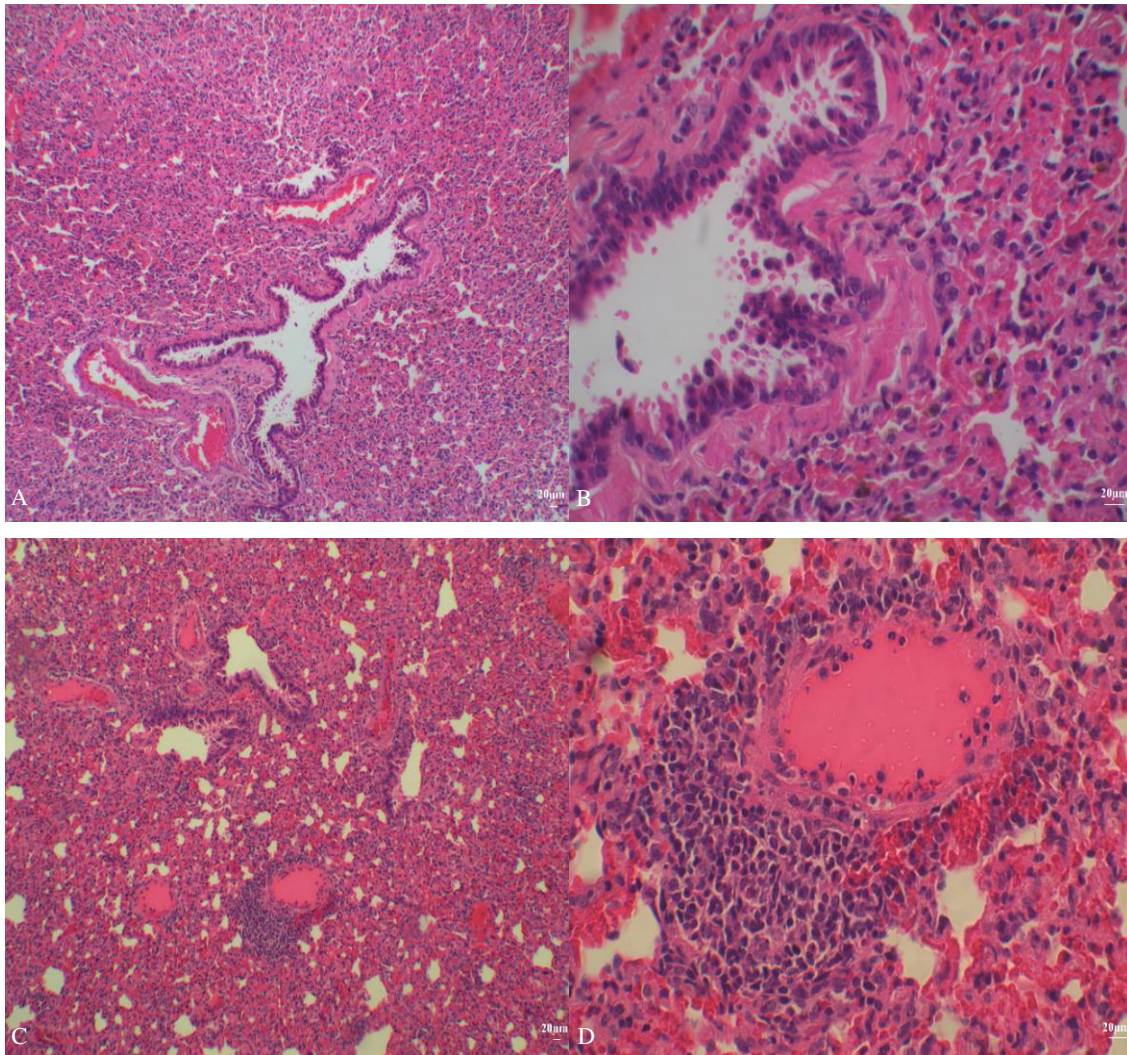


Figura 77 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com 50/50.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE ZZ

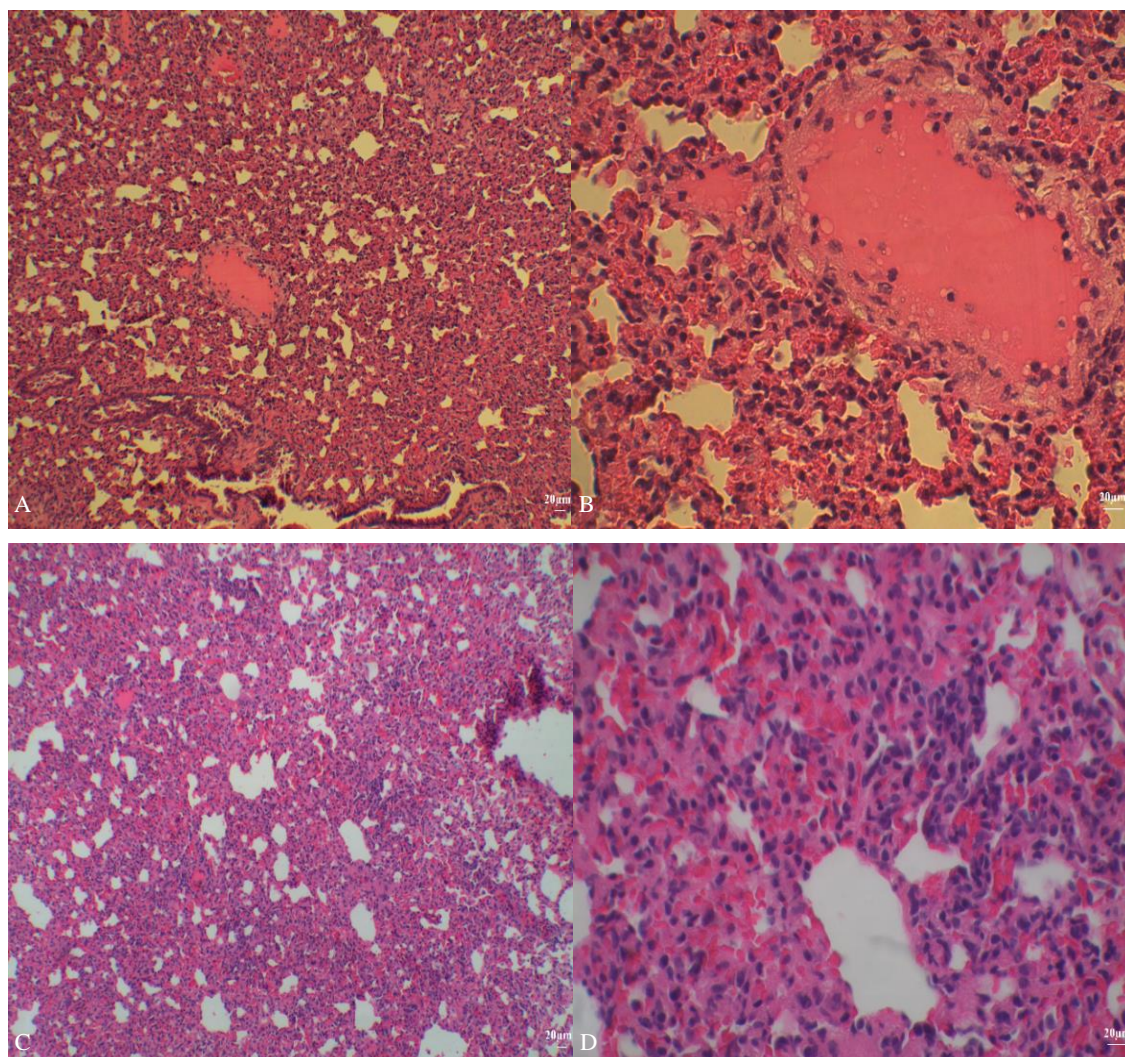


Figura 78- Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com 25/75.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE AAA

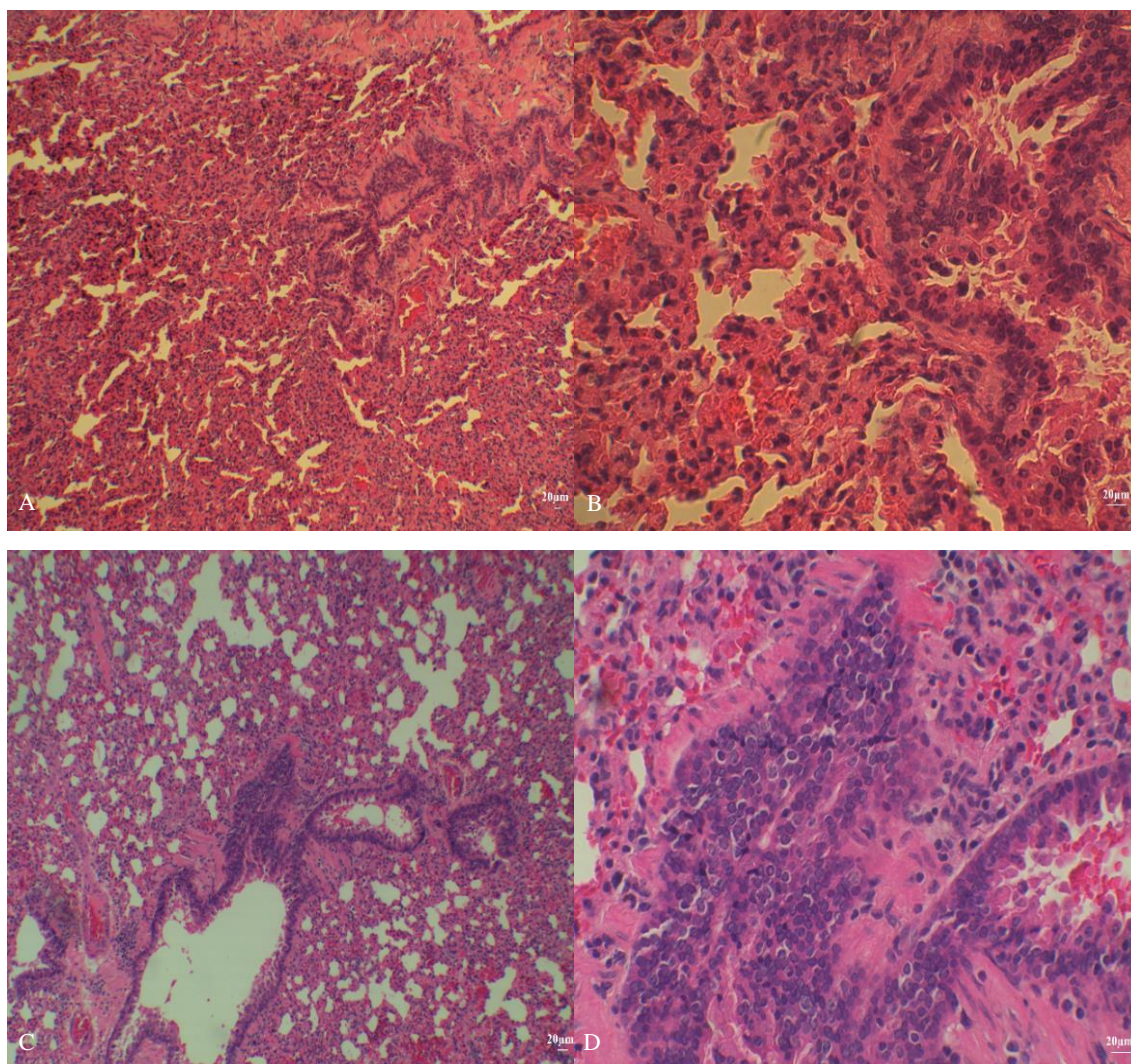


Figura 79 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com GE.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE BBB

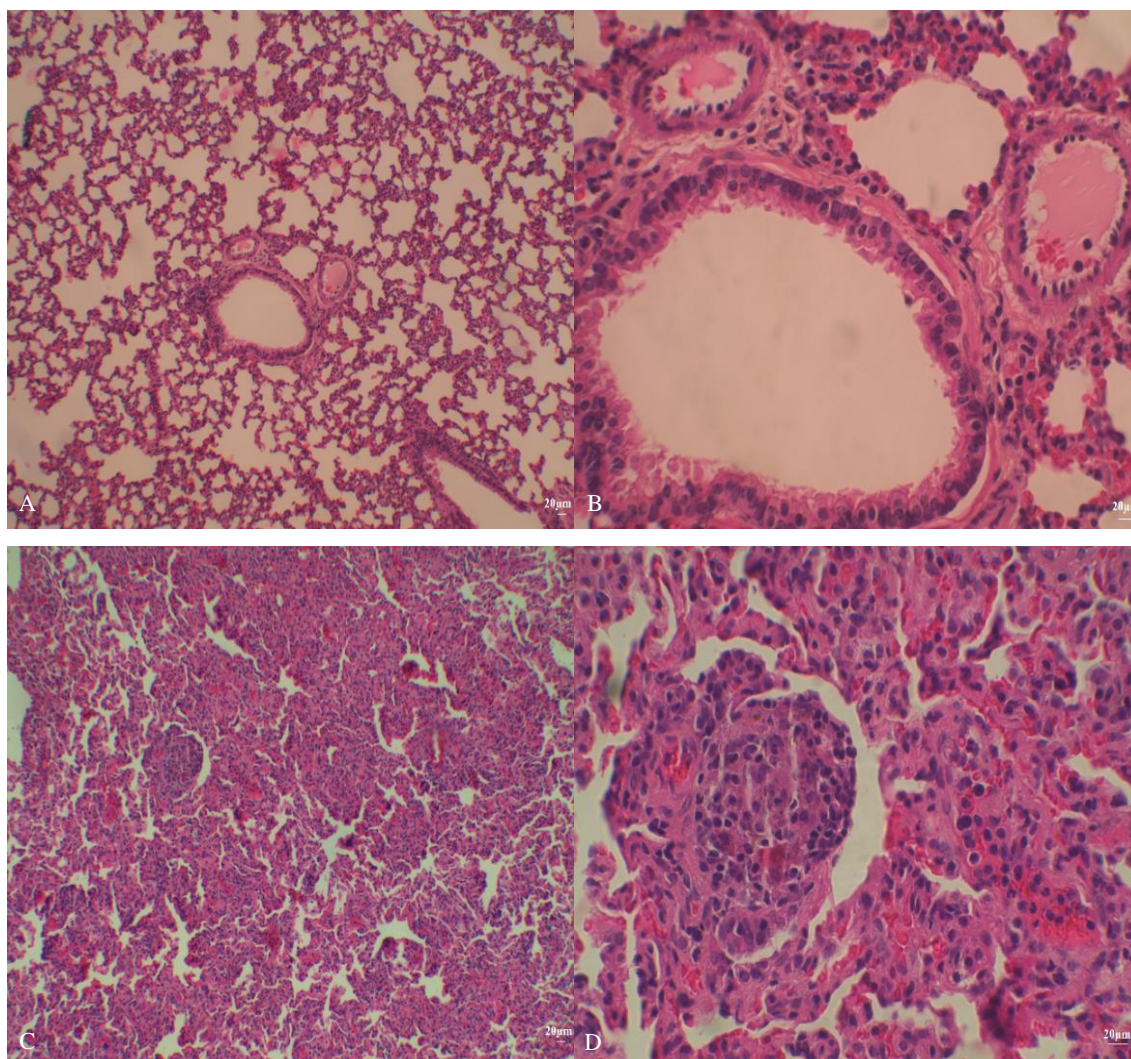


Figura 80 - Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão de hamsters de grupos tratados com Glucantime.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE CCC

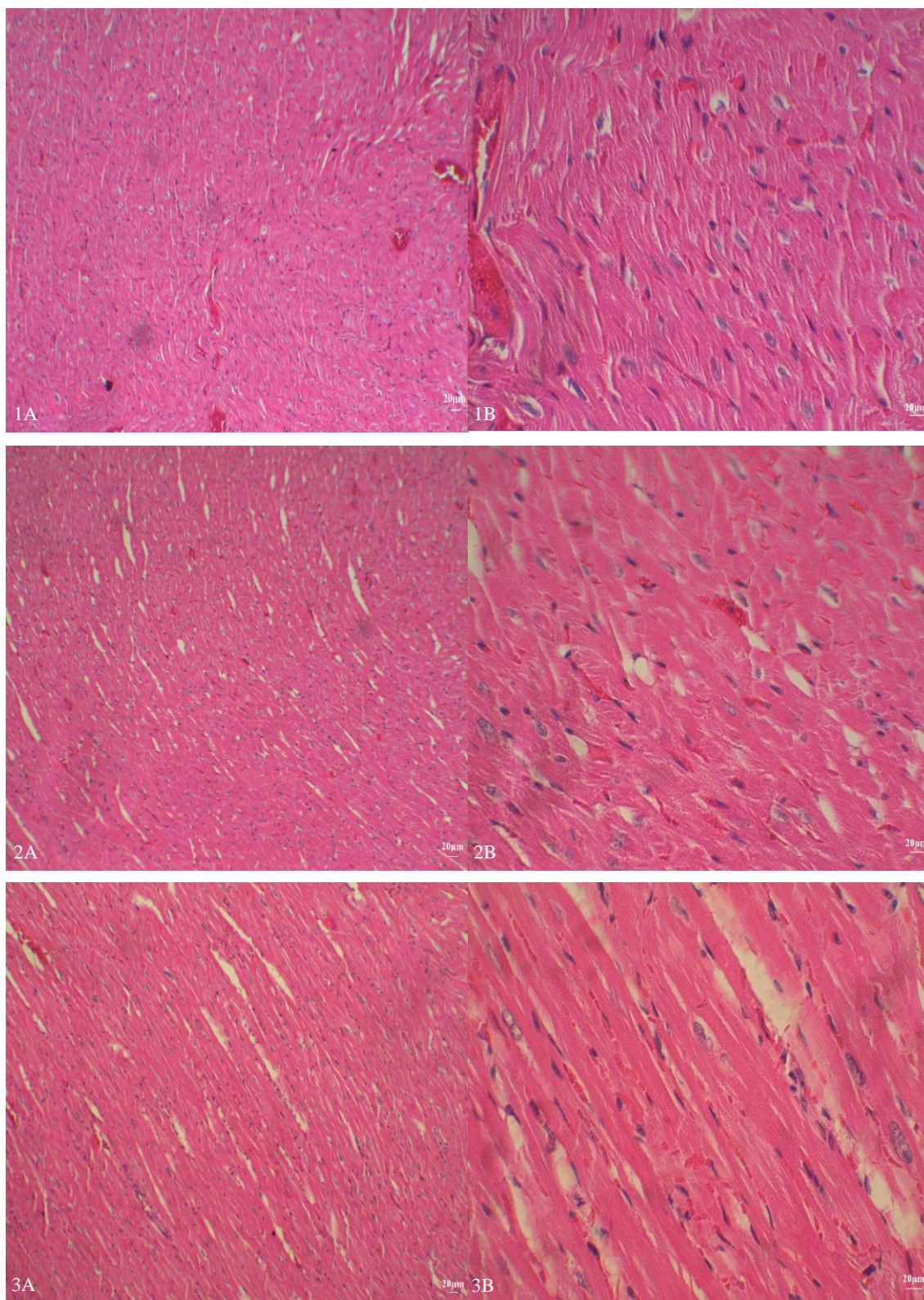


Figura 81 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (1A e 1B) Grupo controle. (2A e 2B) Grupo tratado com HDAB. (3A e 3B) Grupo tratado com 75/25. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x.

APÊNDICE DDD

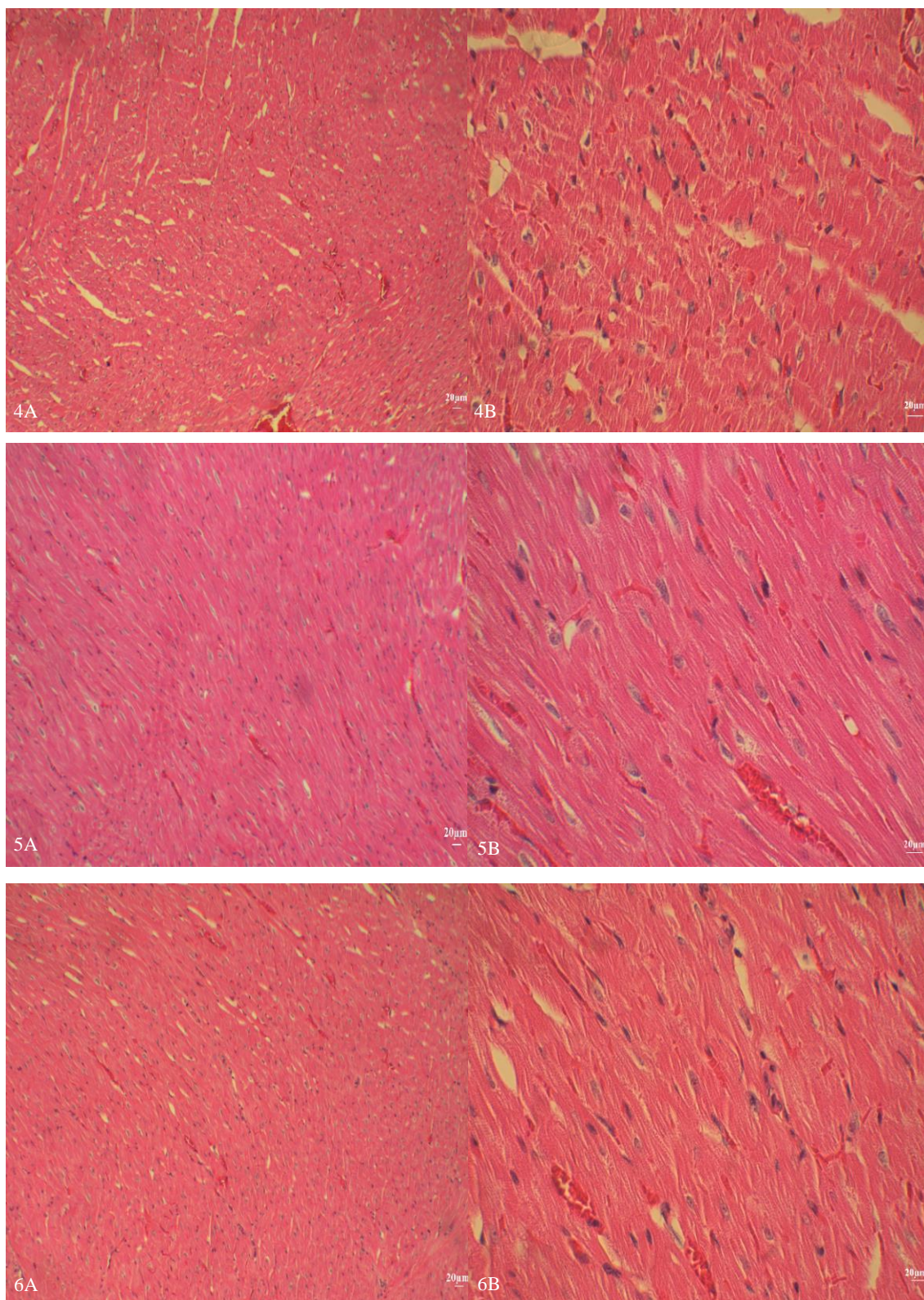


Figura 82 – Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos não infectados.

NOTA: (4A e 4B) Grupo tratado com 50/50. (5A e 5B) Grupo tratado com 25/75. (6A e 6B) Grupo tratado com GE. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens em A: aumento de 100x, imagens em B aumento de 400x.

APÊNDICE EEE

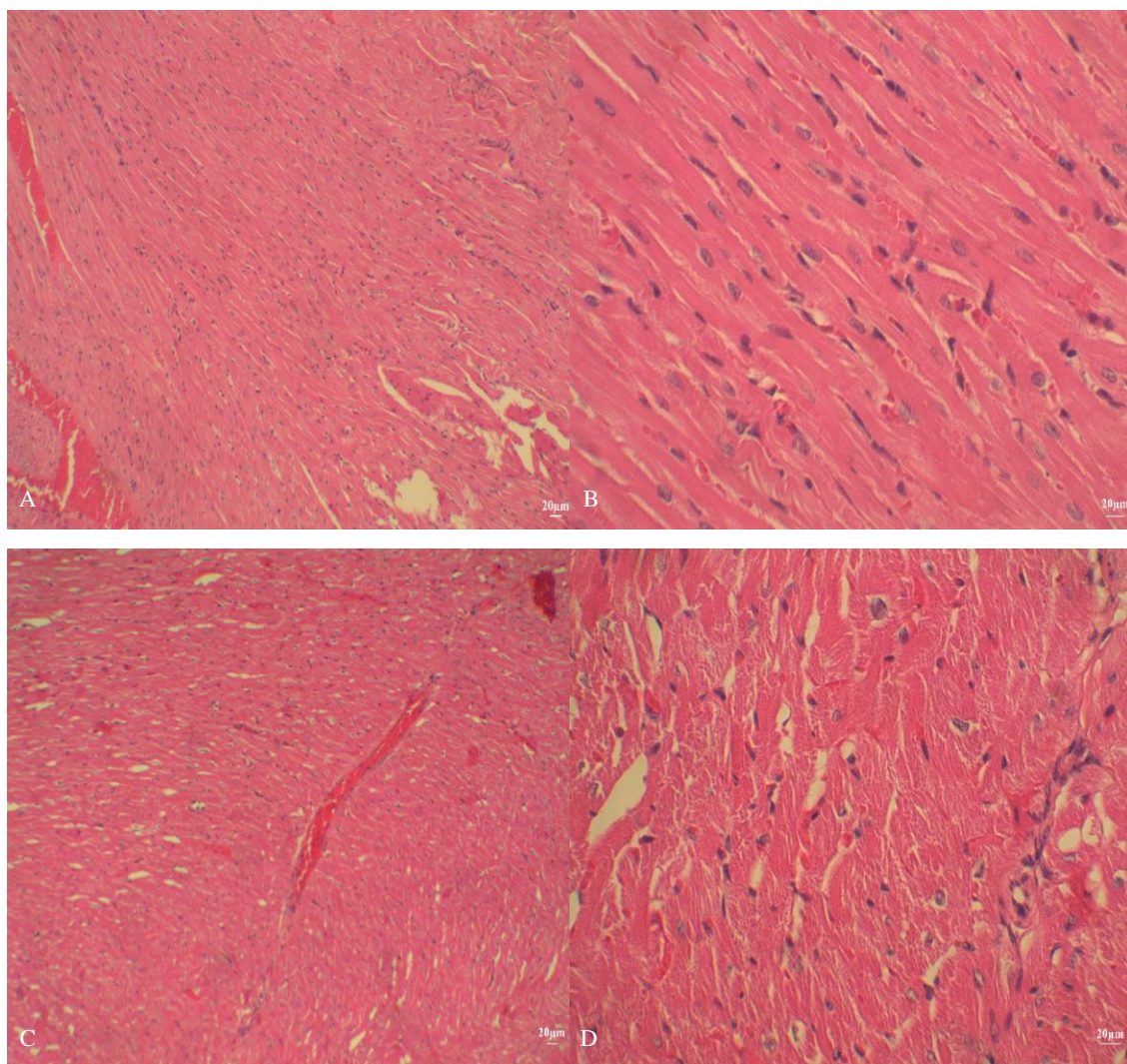


Figura 83 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos infectados não tratados.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE FFF

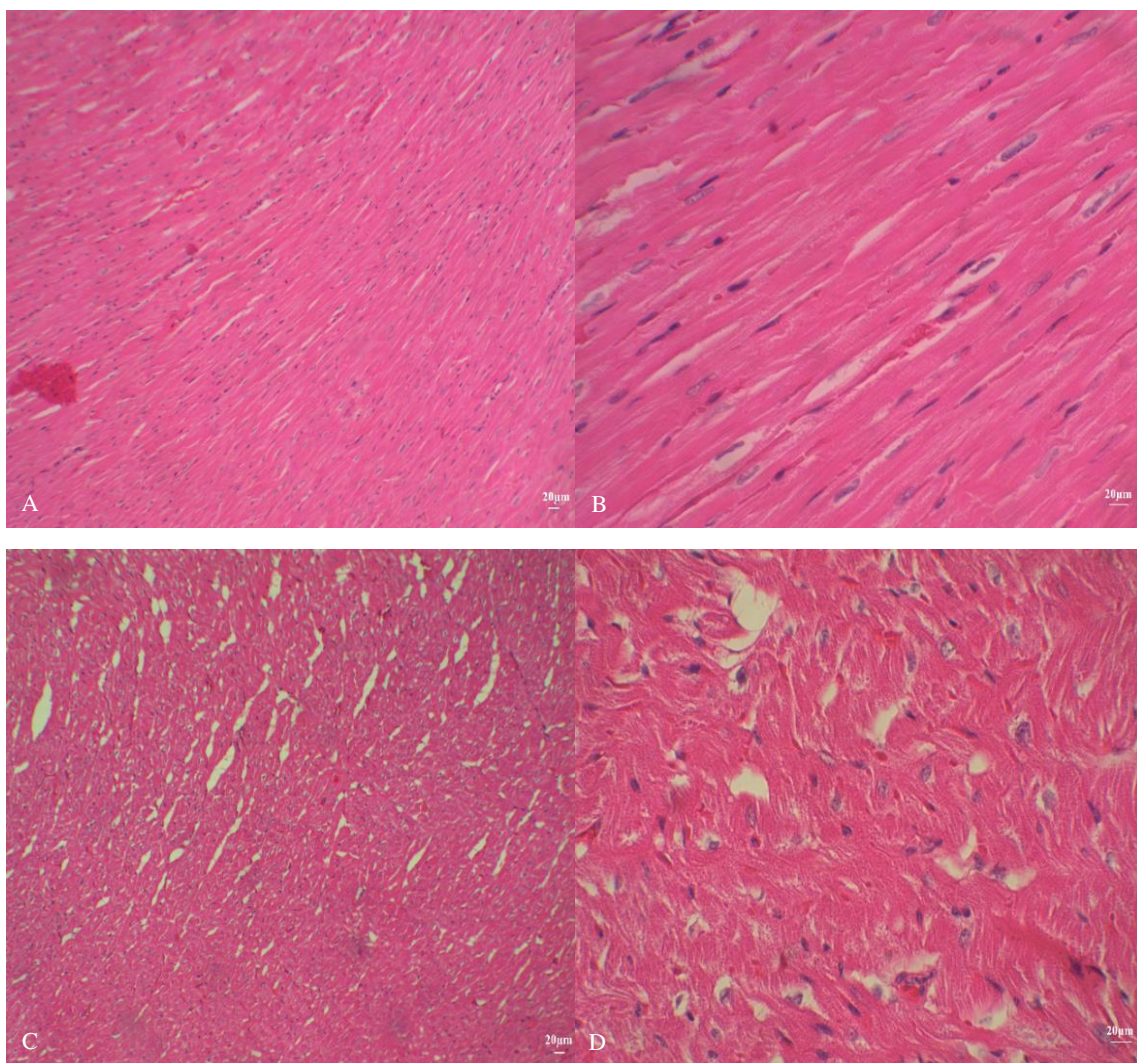


Figura 84 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com HDAB.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE GGG

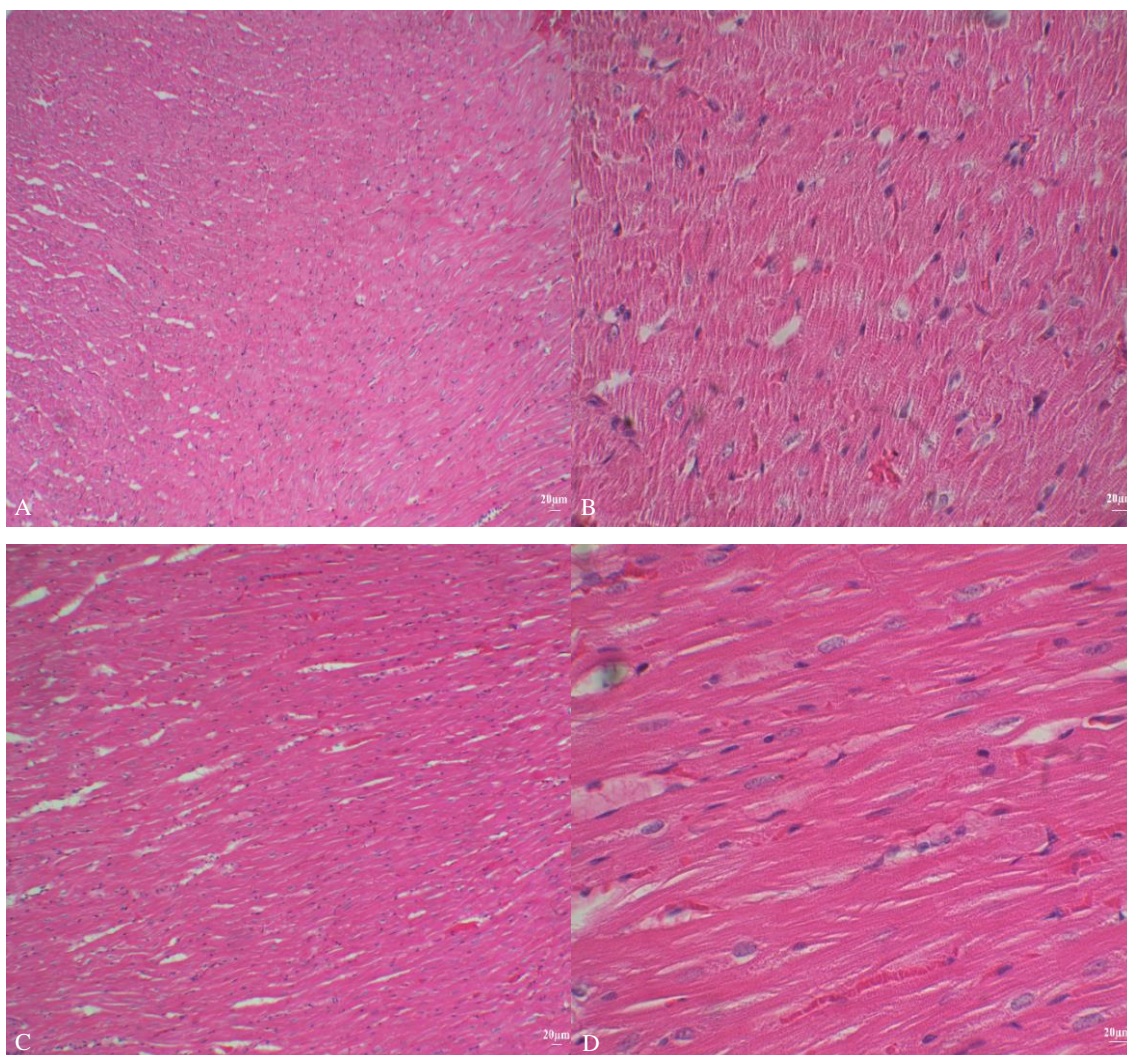


Figura 85 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com 75/25.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE HHH

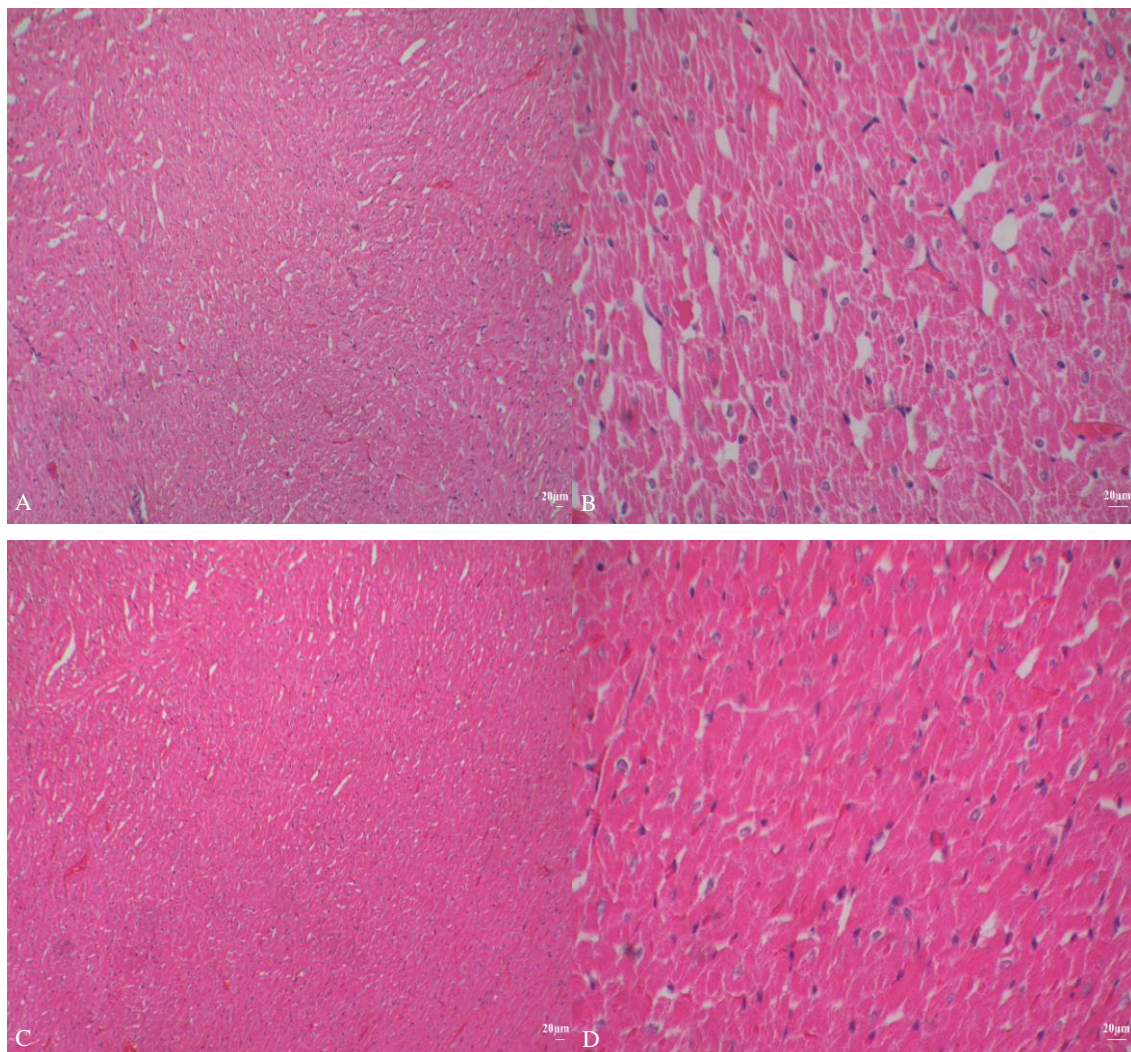


Figura 86 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com 50/50.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE III

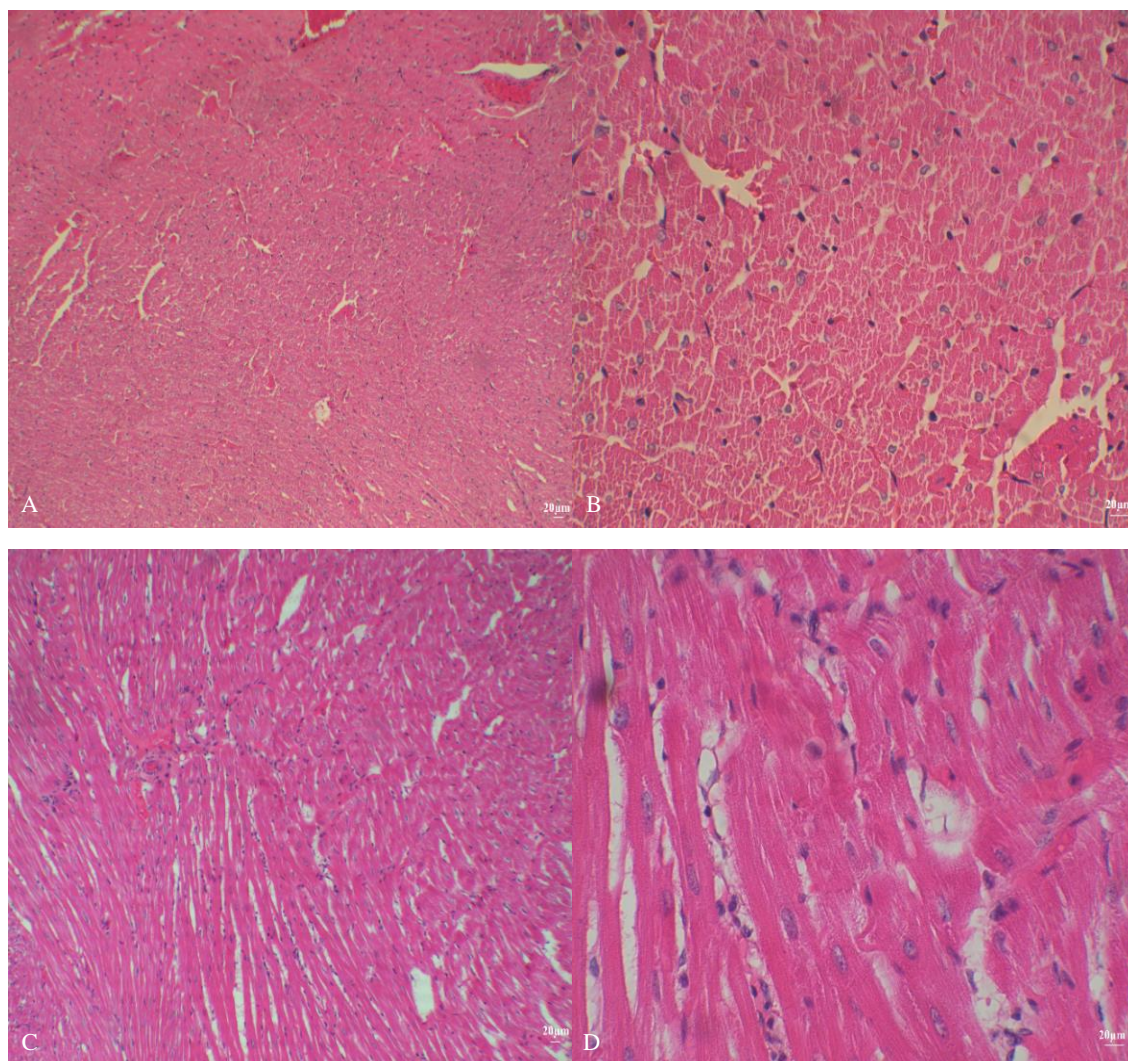


Figura 87 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com 25/75.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE JJJ

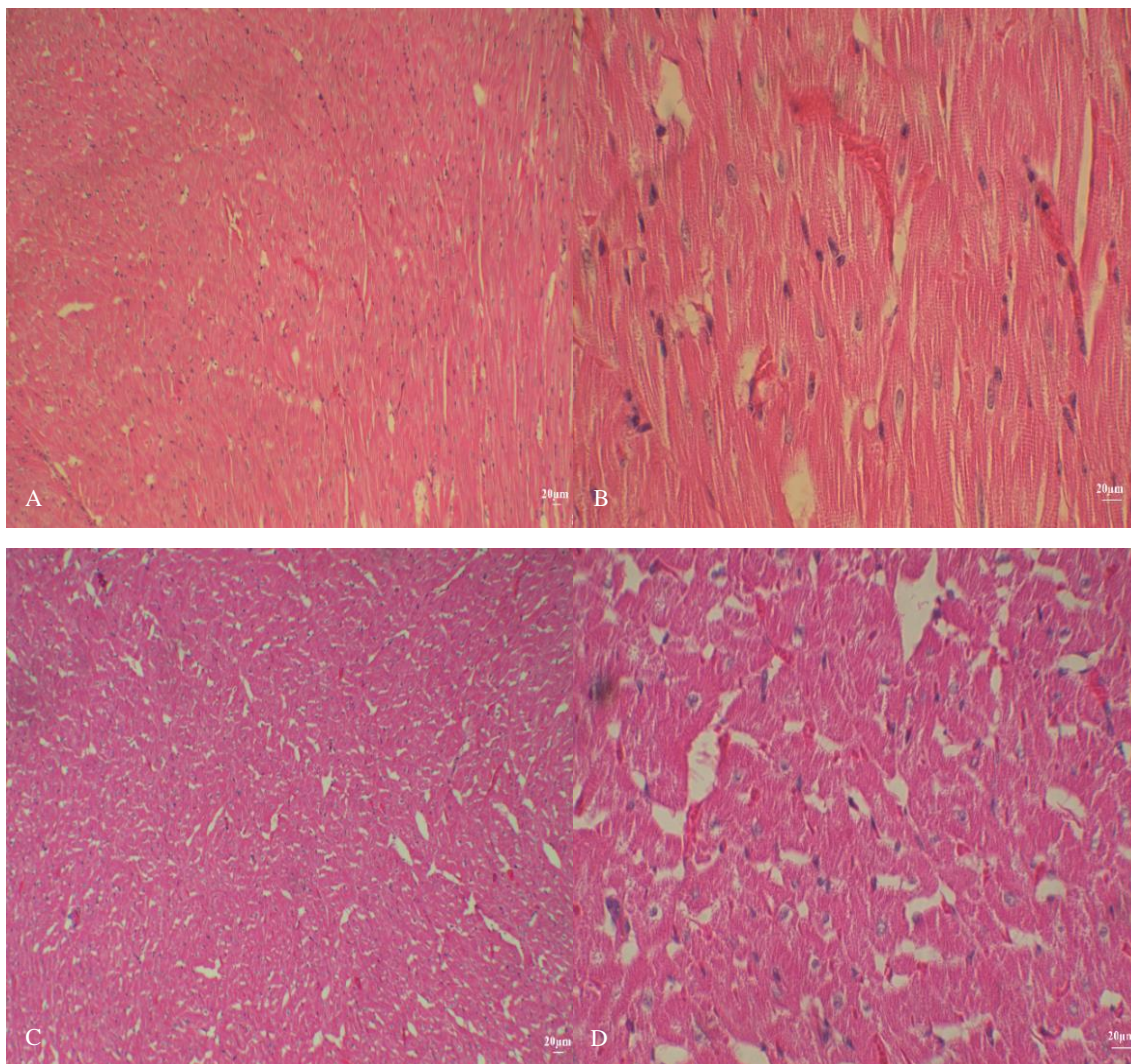


Figura 88 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com GE.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.

APÊNDICE KKK

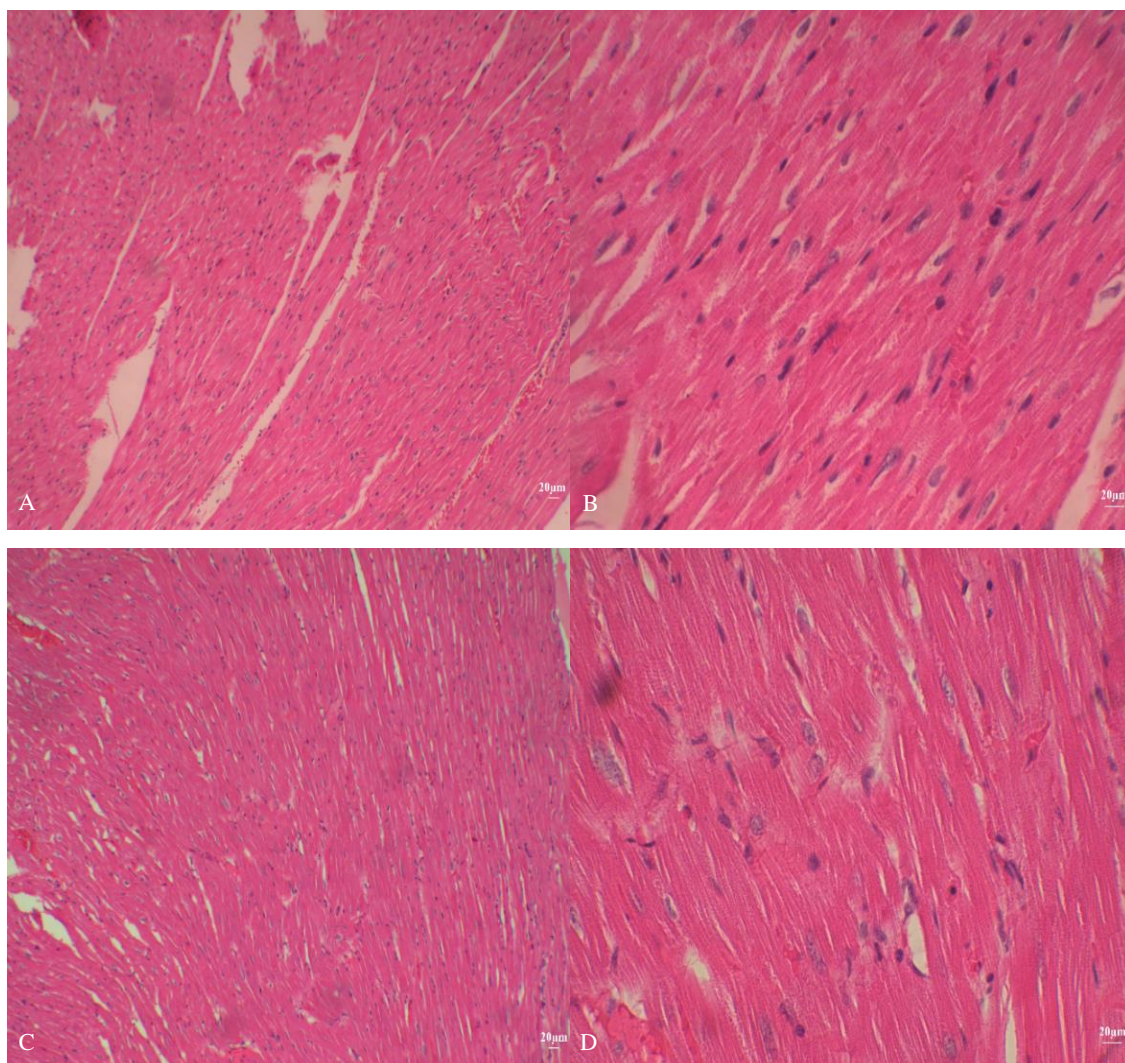


Figura 89 - Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de hamsters de grupos tratados com Glucantime®.

NOTA: (A e B) Grupo infectado com promastigotas. (C e D) Grupo infectado com amastigotas. Coloração Hematoxilina-Eosina. Imagens A e C: aumento de 100x. Imagens B e D: aumento de 400x.