

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*LEISHMANIA* DE DERIVADOS  
MESOIÔNICOS DE 1, 3, 4 TIADIAZÓLIO SOBRE *L. AMAZONENSIS* *IN*  
*VITRO*.**

**ALICE DOS SANTOS ROSA**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*LEISHMANIA* DE DERIVADOS  
MESOIÔNICOS DE 1, 3, 4 TIADIAZÓLIO SOBRE *L AMAZONENSIS* IN  
*VITRO*.**

**ALICE DOS SANTOS ROSA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Lucia Helena Pinto da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Veterinária.

Seropédica, RJ

Março de 2020



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 2877/2020 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.053777/2020-51

Seropédica-RJ, 15 de outubro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ALICE DOS SANTOS ROSA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra **em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/03/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

*(Assinado digitalmente em 15/10/2020 15:25)*

LUCIA HELENA PINTO DA SILVA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matrícula: 1545840

*(Assinado digitalmente em 15/10/2020 22:17)*

JULIANY COLA FERNANDES RODRIGUES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 077.151.437-90

*(Assinado digitalmente em 15/10/2020 15:33)*

EDUARDO CAIO TORRES DOS SANTOS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 025.883.247-97

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:

2877, ano: 2020, tipo: ATA, data de emissão: 15/10/2020 e o código de verificação: 8b57e81ad5

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R788a Rosa , Alice dos Santos , 1992-  
Avaliação do efeito anti-Leishmania de derivados mesoiônicos de 1,3,4 tiadiazólio sobre L. amazonensis in vitro / Alice dos Santos Rosa . - Rio de Janeiro , 2020.  
65 f.: il.

Orientadora: Lucia Helena Pinto da Silva .  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias , 2020.

1. leishmaniose. 2. Leishmania amazonensis. 3. sais mesoiônicos. 4. derivados de 1,3,4-tiadiazólio. 5. quimioterapia. I. Silva , Lucia Helena Pinto da, 1975 , orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias III. Título.

Aos meus pais e irmã, por todo apoio e amor incondicional, essenciais para minha vida e essa trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio, paciência, conselhos e por acreditarem em mim, quando nem mesmo eu acreditava. A minha irmã Gisele pelas broncas, brincadeiras e conselhos. Sem vocês não estaria aqui. Obrigada por tudo, amo vocês.

Um agradecimento extremamente especial para minha avó Irene, que acompanhou de perto minha vida acadêmica desde a pré-escola e sempre me encorajou a alcançar patamares maiores. Obrigada por todas as horas sentadas ao meu lado, enquanto eu estudava.

A minha orientadora Lucia Helena, pela sabedoria e ensinamentos transmitidos, pela paciência e palavras de apoio, quando os experimentos não funcionavam. E principalmente, por me acolher como uma filha, sempre me aconselhando e me incentivando a crescer profissional e pessoalmente. Muito obrigada!

Aos grupos colaboradores da Dra. Áurea Echevarria, da Dra. Georgia Atella, da Dra. Elvira Saraiva e do Dr. Celio Freire de Lima, por me acolherem em seus laboratórios, transmitirem novos conhecimentos e enriquecerem tanto esse trabalho. Um agradecimento especial às alunas, Karoline Lima e Janice Gomes, por serem tão solícitas e sempre me incentivarem.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia da Rural (LIV/UFRRJ), por toda ajuda durante os experimentos, pelos conselhos e dicas repassados, pelas conversas e risadas durante o almoço. Em especial, Raissa Couto e Beatriz Assis, que se tornaram muito mais do que colegas de trabalho. Obrigada, não poderia desejar amigos de laboratório melhores.

Aos meus amigos, pelos momentos compartilhados, conversas e risadas. Em especial ao meu amigo Igor Dias, por aturar meus assuntos infinitos sobre a Rural, pelas conversas com “vídeo de gatinho”, pelos conselhos e por não deixar a “vida adulta” afastar a nossa amizade. Muito obrigada, você é o melhor amigo que alguém poderia ter.

As Instituições de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro necessário para realização desse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram dessa caminhada e me fizeram ser alguém melhor. Obrigada!

Quem é você?

Eu... Eu mal sei, Sir, neste exato momento... Pelo menos sei quem eu era quando me levantei esta manhã, mas acho que já passei por várias mudanças desde então.

(Lewis Carroll, Alice no País das Maravilhas, 1865)

## RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças que afetam milhões de pessoas anualmente no mundo, principalmente a população em vulnerabilidade econômica, por tal razão essa enfermidade faz parte do grupo de doenças negligenciadas. As leishmanioses são causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* e transmitidas a diversos mamíferos, incluindo o homem e o cão doméstico, por dípteros pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Suas manifestações clínicas variam conforme a espécie de mamífero infectado, apresentando em humanos um amplo espectro clínico, e no cão, manifestações viscero-cutâneas. Os fármacos utilizados no tratamento dessa doença possuem elevado custo de produção e uma alta toxicidade, gerando diversos efeitos colaterais. Além disso, em países endêmicos, têm ocorrido o aparecimento de cepas resistentes. Por esses motivos, torna-se necessário a busca por novas moléculas bioativas. Os sais mesoiônicos são uma subclasse do grupo betaína amplamente estudada pela indústria farmacêutica desde a década de 50, que exibem extensa atividade biológica. Nosso trabalho tem por objetivo analisar os efeitos citotóxicos de três compostos mesoiônicos, MI-4 Cl (4-fenil-5-(4-cloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina), MI-3,4 diCl (4-fenil-5-(3,4-dicloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) e MI-3,4 diF (4-fenil-5-(3,4-difluor-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina), sobre *Leishmania amazonensis in vitro*. Para avaliar o efeito anti-promastigotas, promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações dos sais mesoiônicos por até 72 horas. Nossos resultados demonstram que os sais mesoiônicos MI-3,4 diCl, MI-4Cl e MI-3,4 diF foram tóxicos, tendo valores de IC<sub>50</sub>/48 h de 14,3, 40,1 e 61,8 µM, respectivamente. O efeito anti-amastigota foi avaliado em macrófagos infectados e nossos resultados demonstram que os compostos clorados possuem efeito tóxico contra as amastigotas com IC<sub>50</sub>/24 h de 33 µM (MI-4Cl) e 43 µM (MI-3,4diCl). Nenhum dos compostos mesoiônicos testados apresentam toxicidade para célula hospedeira até a concentração testada de 100 µM. A produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados ou não com LPS na presença dos sais demonstrou que somente o composto MI-3,4 diCl reduziu os níveis de NO em até 2x. A análise do perfil lipídico de promastigotas tratadas com os sais mesoiônicos não mostrou alteração na composição dos lipídios neutros. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial, mostrou que somente o composto MI-4Cl foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em 50%. Portanto, os resultados sugerem que os sais mesoiônicos MI-4Cl e MI-3,4diCl apresentam um potencial efeito anti-*Leishmania*.

**Palavras-chave:** leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, sais mesoiônicos, derivados de 1,3,4-tiadiazólio, quimioterapia.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases which affect millions of people annually around world mainly in the population in economic vulnerability, for this reason, this disease is part of a group of neglected diseases. Leishmaniasis is caused by protozoa of the *Leishmania* genus and transmitted to several mammals, including the man and domestic dog, by diptera belonging to the *Lutzomyia* and *Phlebotomus* genus. Its clinical manifestations vary according to the species of infected mammal, presenting in humans a broad clinical spectrum, and visceral-cutaneous manifestations in the dog. Drugs used in treatment have high production costs and a high toxicity, presents several side effects. In addition, in endemic countries, resistant strains have been reported. Therefore, the search for new bioactive molecules is necessary. Mesoionic salts are a subclass of the betaine group, widely studied by the pharmaceutical industry since the 1950s, and exhibit extensive biological activity. Our work aims to analyze the cytotoxic effects of three mesoionic compounds, MI-4 Cl (4-phenyl-5- (4-chloro-phenyl) -1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine), MI-3,4 diCl (4-phenyl-5- (3,4-dichloro-phenyl) -1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine) and MI-3,4 diF (4-phenyl-5- (3,4-difluor-phenyl ) -1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine), on *Leishmania amazonensis* *in vitro*. To evaluate the anti-promastigote effect, *L. amazonensis* promastigotes were incubated with different concentrations of mesoionic salts during 72 hours. Our results show that the mesoionic salts MI-3,4 diCl, MI-4Cl and MI-3,4 diF were toxic, with IC<sub>50</sub>/48 h values of 14.3, 40.1 and 61.8 μM, respectively. The anti-amastigote effect was evaluated in infected macrophages, and results demonstrate that chlorine compounds have a toxic effect against amastigotes present IC<sub>50</sub>/24 h of 33 μM (MI-4Cl) and 43 μM (MI-3,4diCl). None of the mesoionic compounds tested present host cell toxicity up to the tested concentration of 100 μM. Nitric oxide (NO) production in macrophages stimulated or not with LPS in the presence of the salts showed that only the MI-3,4 diCl compound reduced 2 times the NO levels. Lipid profile analysis of treated-promastigotes showed no alteration of neutral lipids. Mitochondrial membrane potential evaluation showed that MI-4Cl compound was the only one able to reduce mitochondrial membrane potential by 50%. Therefore, the results suggest that the mesoionic salts MI-4Cl and MI-3,4diCl have a potential anti-*Leishmania* effect.

**Keywords:** leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, mesoionic salts, 1,3,4-thiadiazolium derived compounds, chemotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Árvore filogenética da família Trypanosomatidae. ....	17
<b>Figura 2:</b> Status de endemismo da leishmaniose cutânea em todo o mundo - 2018. ....	18
<b>Figura 3:</b> Status de endemismo da leishmaniose visceral em todo o mundo - 2018. ....	19
<b>Figura 4:</b> Esquema tridimensional dos estágios de desenvolvimento do protozoário <i>Leishmania</i> . ....	22
<b>Figura 5:</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> . ....	23
<b>Figura 6:</b> Morfotipos forma promastigota de <i>Leishmania</i> durante a metaciclo genese. ....	24
<b>Figura 7:</b> Pacientes apresentando lesões de leishmaniose cutânea. ....	25
<b>Figura 8:</b> Cicatrizes das lesões causadas pela leishmaniose cutânea. ....	25
<b>Figura 9:</b> Paciente apresentando lesões acneiformes de leishmaniose cutânea disseminada. ....	26
<b>Figura 10:</b> Paciente apresentando lesão de leishmaniose atípica. ....	27
<b>Figura 11:</b> Paciente apresentando lesões de leishmaniose cutânea difusa. ....	27
<b>Figura 12:</b> Paciente apresentando destruição da mucosa oronasal devido à lesão causada pela leishmaniose mucocutânea. ....	28
<b>Figura 13:</b> Paciente com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia. ....	29
<b>Figura 14:</b> Pacientes apresentando lesões causadas pela leishmaniose dérmica pós-calazar. ....	30
<b>Figura 15:</b> Fórmula química dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. ....	31
<b>Figura 16:</b> Lesão ulcerativa em gato causada pela <i>Leishmania infantum</i> . ....	34
<b>Figura 17:</b> Manifestações clínicas da leishmaniose canina. ....	36
<b>Figura 18:</b> Estrutura heterocíclica do sal mesoiônico apresentando um anel com carga interna positiva contra balanceado por um átomo exocíclico (f) de carga negativa. ....	37
<b>Figura 19:</b> Isômeros do anel tiadiazólio. ....	38
<b>Figura 20:</b> Estrutura química dos compostos mesoiônicos cloreto de 4 fenil-5-(X - fenil) - 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= 4 Cl; 3,4 diCl e 3,4 diF). ....	40
<b>Figura 21:</b> Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	46
<b>Figura 22:</b> Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	47
<b>Figura 23:</b> Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	47
<b>Figura 24:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> por XTT. ....	48
<b>Figura 25:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais. ....	49
<b>Figura 26:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais. ....	49
<b>Figura 27:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. ....	50
<b>Figura 28:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. ....	51
<b>Figura 29:</b> Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. ....	51
<b>Figura 30:</b> Dosagem de Óxido Nítrico (NO). ....	52
<b>Figura 31:</b> Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocôndrial ( $\Delta\Psi_m$ ). ....	53
<b>Figura 32:</b> Perfil Lipídico de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . ....	54

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Tropismo das espécies de <i>Leishmania</i> .....	18
<b>Quadro 2:</b> Número de casos e incidência da leishmaniose no continente americano no ano de 2018.....	20
<b>Quadro 3:</b> Valores calculados de Log P e $\sigma$ para MI- 4 Cl. B= MI-3,4 diCl. C= MI-3,4 diF40	

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA/IV - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária

CHO - colesterol

CHOE - colesterol esterificado

CITEC - Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde

CR1 - receptor do sistema complemento 1

CR3 - receptor do sistema complemento 3

DAG - diacilglicerol

DMEM - “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”

DMSO - dimetilsulfóxido

FA - ácido graxo

FDA - “Food and Drug Administration”

FeLV - Vírus da Leucemia Felina

FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina

GP63 - glicoproteína 63

IFN-  $\gamma$  - interferon gama

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IL-4 – interleucina- 4

IL-5 – interleucina- 5

LPG - lipofosfoglicano

MAG - monoacilglicerol (MAG)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MS - Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PBS – Solução tampão fosfato salina

PMS - Phenazine Methosulfate

PSG - promastigota

SDS - dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro Fetal Bovino

SisLeish - Sistema de Informação Regional das Leishmanioses nas Américas

TAG - triacilglicerol

TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador - beta

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

UFF - Universidade Federal Fluminense

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

XTT - 2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1.	Ciclo Biológico	21
2.2.	Formas Clínicas	24
2.3.	Tratamento	30
2.4.	Leishmaniose e sua Importância Veterinária	33
2.4.1.	Leishmaniose felina	34
2.4.2.	Leishmaniose canina	35
2.5.	Sais Mesoioônicos	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
3.1.	Objetivos Específicos	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	42
4.1.	Sais Mesoioônicos	42
4.2.	Parasitas	42
4.3.	Animais	42
4.4.	Células	42
4.5.	Obtenção de Macrófagos Murinos Peritoneais	42
4.6.	Efeito Citotóxico sobre Formas Promastigotas	42
4.6.1.	Cinética	43
4.6.2.	Ensaio de XTT	43
4.7.	Efeito Citotóxico sobre Macrófagos Peritoneais	43
4.7.1.	Ensaio de XTT	43
4.7.2.	Coloração com “Trypan Blue”	43
4.8.	Efeito Citotóxico sobre Formas Amastigotas	44
4.9.	Dosagem de Oxido Nítrico (NO)	44
4.10.	Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial	44
4.11.	Efeito sobre Perfil Lipídico	44
4.11.1.	Extração lipídica	45
4.11.2.	Gravimetria	45
4.11.3.	Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)	45
4.12.	Análise Estatística	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	46
5.1.	Efeito Citotóxico sobre Formas Promastigotas	46

<b>5.2. Efeito Citotóxico sobre Macrófagos Peritoneais</b> .....	48
<b>5.3. Efeito Citotóxico sobre Formas Amastigotas</b> .....	50
<b>5.4. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)</b> .....	52
<b>5.5. Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial (<math>\Delta\Psi_m</math>)</b> .....	52
<b>5.6. Efeito sobre Perfil Lipídico</b> .....	53
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59

# 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias que afetam a população economicamente vulnerável das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas estejam em regiões de risco e que 1,29 milhão de novos casos ocorra anualmente.

O agente etiológico dessa doença é um parasito heteroxeno do gênero *Leishmania*, que apresentam dois estágios do desenvolvimento: promastigota e amastigota. A amastigota são formas intracelulares obrigatórias de células do sistema mononuclear fagocitário, enquanto as promastigotas são formas alongadas e flageladas encontradas no intestino do inseto vetor. Os vetores dessa doença são dípteros pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, e encontram-se distribuídos no Novo e Velho Mundo, respectivamente.

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que varia conforme a espécie da *Leishmania*, a resposta imunológica e o hospedeiro. No caso de humanos, o espectro clínico se divide em manifestações tegumentares, sendo as principais a leishmaniose cutânea e mucocutânea, e manifestações viscerais (leishmaniose visceral), sendo essa a mais letal, responsável por 30 mil mortes anuais no mundo.

Os cães também podem ser infectados por esse parasito, sendo o principal reservatório da espécie *Leishmania infantum*. A leishmaniose canina apresenta um quadro clínico que varia de assintomático, oligosintomático e sintomático, que possui como principais manifestações clínicas lesões cutâneas, onicogribose, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e comprometimento das funções renais.

O tratamento da leishmaniose, independente do hospedeiro mamífero, é realizado pela administração dos medicamentos: antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paranomicina, pentamidina, azóis e miltefosina. Todos esses tratamentos são longos, apresentam diversos efeitos colaterais e, com exceção da miltefosina, possuem administração parenteral o que dificulta o tratamento. Além disso, esses fármacos são caros e o surgimento de cepas resistentes para todos esses medicamentos já foi descrito, principalmente para os antimoniais pentavalentes, os quais não estão sendo mais utilizados na Índia.

Entretanto em muitos países, como o Brasil, o uso de medicamentos humanos para o tratamento da leishmaniose canina é proibido, sendo recomendados tratamentos profiláticos, como repelentes e vacinas, e eutanásia dos animais soropositivos. No Brasil desde 2016 o tratamento com miltefosina é aprovado exclusivamente para uso canino, com custo elevado e sendo de total responsabilidade do proprietário. Por essas razões, a busca por princípios ativos que sejam eficazes, com poucos efeitos colaterais e de baixo custo, torna-se necessário.

Os compostos mesoiônicos são uma subclasse do grupo betaína caracterizados pela presença de um anel aromático formado por cinco membros e que possui carga parcial positiva contrabalanceada por um heteroátomo exocíclico de carga negativa. Essa estrutura faz com que a molécula possua carga neutra, o que permite sua interação com membranas biológicas. Tais características conferem ação analgésica, anti-inflamatória, antiespasmódica, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiparasitária.

Nesse trabalho avaliamos os efeitos citotóxicos de três derivados mesoiônicos de 4fenil-5-(X - fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= 4 Cl; 3,4 diCl e 3,4 diF) sobre ambos os estágios do desenvolvimento da espécie *Leishmania amazonensis in vitro* e sua toxicidade para a célula hospedeira.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. Os primeiros relatos da doença datam do período pré-colombiano, mas seu agente etiológico só foi descrito no final do XIX, quando David Douglas Cunningham, em 1885, noticiou a presença de um parasito arredondado em pacientes diagnosticados com calazar. Posteriormente William Boog Leishman e Charles Donovan o descreveram como um tripanossomatídeo, em 1900 e 1903, respectivamente (FIOCRUZ, 1997; HANDMAN, 1999; STEVERDING, 2017).

Atualmente são descritas em torno de 52 espécies para o gênero *Leishmania*, divididas em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Vianna*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*. O gênero *Sauroleishmania* compreende 21 espécies parasitas de répteis, enquanto os demais gêneros compreendem 31 espécies parasitas de mamíferos. Destas, aproximadamente 20 espécies são capazes de parasitar humanos (**Figura 1**) (ESPINOSA et al, 2016; AKHOUNDI et al, 2016).

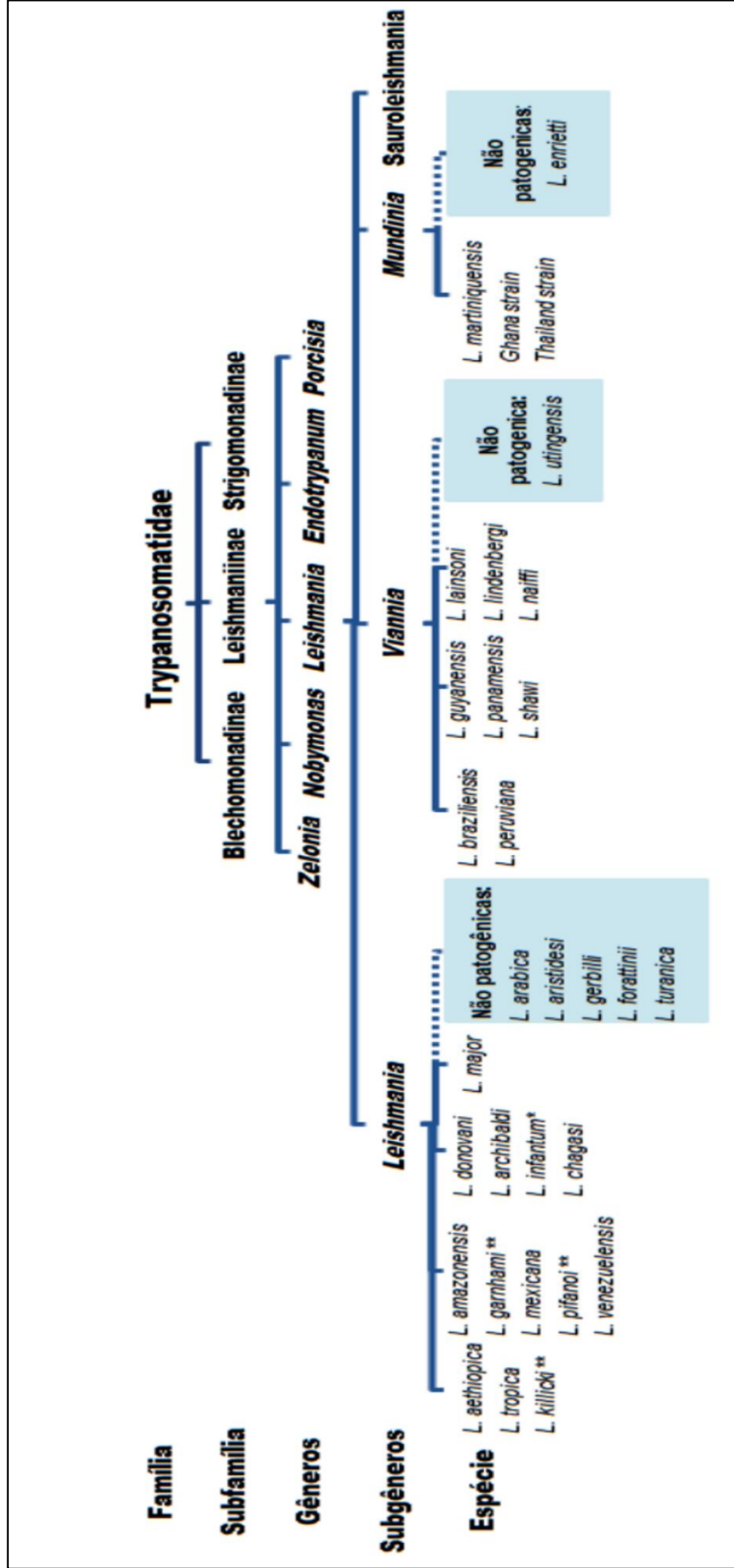
As espécies causadoras de enfermidades em humanos possuem tropismo por diferentes órgãos e tecidos (tegumentar, mucosa e visceral) (**Quadro 1**), ocasionando diversas manifestações clínicas que variam conforme a severidade da doença. A leishmaniose tegumentar agrupa as formas clínicas que acometem a pele, sendo considerada a mais comum e menos letal, enquanto a leishmaniose visceral é a mais letal, por provocar um quadro clínico severo de hepatoesplenomegalia que, se não tratado, leva o paciente a óbito (TEIXEIRA et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2017; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

As leishmanioses possuem ampla distribuição pelo mundo, ocorrendo em todos os cinco continentes e sendo endêmica em 102 países localizados nas regiões tropicais e subtropicais (**Figura 2 e 3**). Estima-se que 1 bilhão de pessoas estejam em áreas de risco e que sejam registrados até 1,29 milhão de novos casos anualmente (leishmaniose cutânea de 600 mil a 1,2 milhão; e leishmaniose visceral de 60 mil a 90 mil), dos quais cerca de 20 a 30 mil pacientes venham a óbito (OPAS, 2019<sup>a</sup>; DNDi, 2019<sup>a</sup>).

Segundo dados do Sistema de Informação Regional das Leishmanioses nas Américas (SisLeish), coletados em 18 países (**Quadro 2**), em 2018 foram registrados 46.041 casos de leishmaniose cutânea e 3.562 casos de leishmaniose visceral no continente Americano. Desse total, 36% (16.432) dos casos de leishmaniose cutânea e 97% (3.466) dos casos de leishmaniose visceral, ocorreram no Brasil. O país também apresenta elevado número de casos se comparado aos dados mundiais, representando junto com a Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia, 90% dos casos de leishmaniose visceral; e junto com Afeganistão, Irã, Iraque e Síria, 75% dos casos leishmaniose cutânea, reportados mundialmente (OPAS, 2019<sup>a</sup>; OPAS, 2019<sup>b</sup>).

No Brasil, a leishmaniose pode ser causada por uma das 8 espécies identificadas no país, sendo seis do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania* (**Quadro 1**). Tendo como principais espécies: a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, causadoras da leishmaniose tegumentar; e a *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinonímia de *Leishmania (Leishmania) chagasi*), causadora da leishmaniose visceral (TEIXEIRA et al., 2013).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), em 2018, o número de casos da doença no continente Americano, reduziu quando comparado às ocorrências registradas em 2017 (49.961 e 4.239 novos casos de leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente, conforme dados do SisLeish). Entretanto, no mesmo período, foi observada uma expansão das regiões afetadas pela doença, com relato de novos casos em áreas antes não endêmicas, como por exemplo, o primeiro registro de caso autóctone humano de leishmaniose visceral no Uruguai (OPAS, 2019<sup>b</sup>).

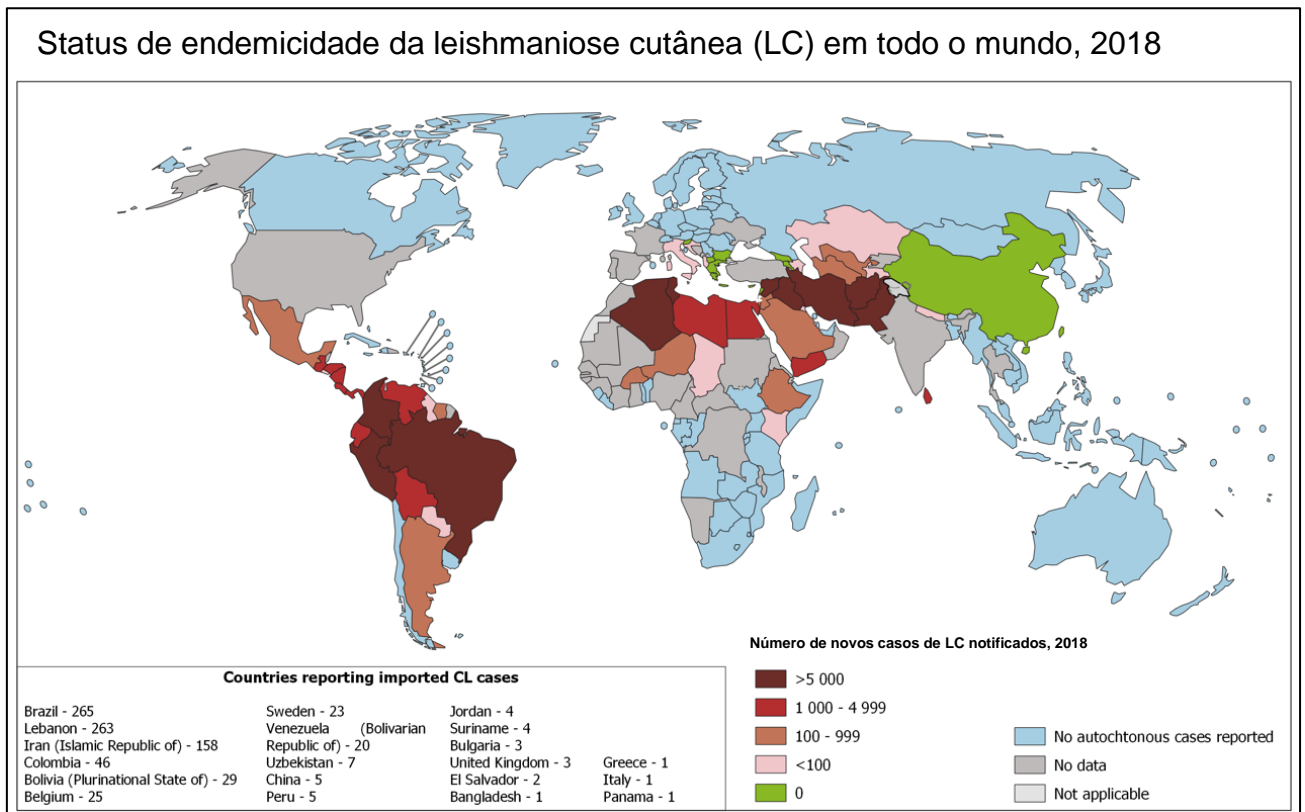


**Figura 1:** Árvore filogenética da família Trypanosomatidae. \* *Leishmania infantum* sinônimo de *Leishmania chagasi*; \*\* *status de espécie em discussão*.  
 Fonte: adaptado de ESPINOSA et al, 2016 e AKHOUNDI et al, 2016

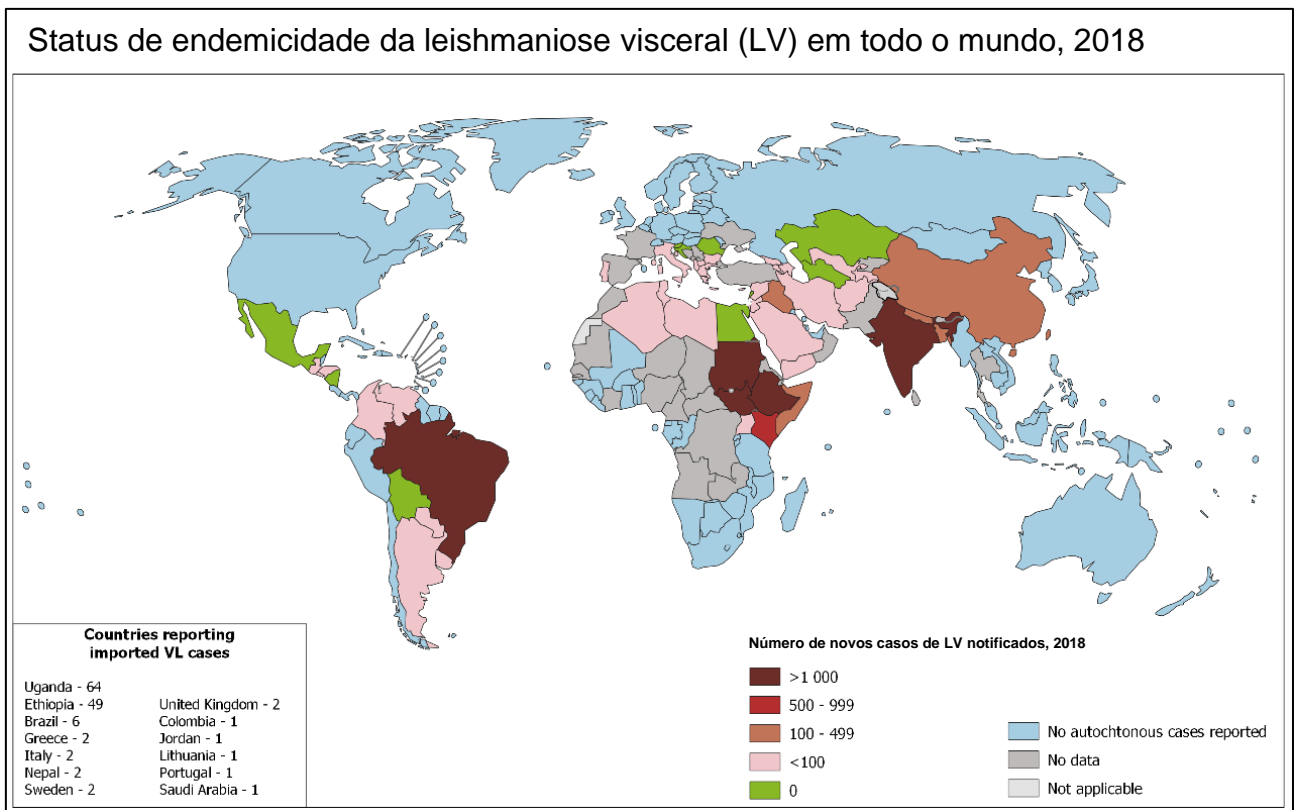
**Quadro 1:** Tropismo das espécies de *Leishmania*.

	TROPISMO	VISCERAL	CUTÂNEO	MUCOSO	
<b>Subgnênero</b>	Mundia	<i>L. martiniquensis</i>	<i>L. martiniquensis</i>		Novo mundo e Velho mundo
	Lesihmania	<i>L. infantum</i> *	<i>L. infantum</i> *		
		<i>L. donovani</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. major</i>		Velho Mundo
		<i>L. chagasi</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. venezuelensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	Novo Mundo
Viannia		<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. naiffi</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. panamensis</i>		

\**Leishmania infantum* sinônimo de *Leishmania chagasi*. Fonte: Adaptado de AKHOUNDI et al, 2016 e OPAS, 2019<sup>a</sup>.



**Figura 2:** Status de endemismo da leishmaniose cutânea em todo o mundo - 2018. Fonte: OMS



**Figura 3:** Status de endemismo da leishmaniose visceral em todo o mundo - 2018. Fonte: OMS

Essa expansão geográfica também é observada em outras regiões do mundo, como no Oriente Médio, onde estudos tem demonstrado o aumento do número de casos de leishmaniose cutânea em 6 países (Turquia, Iêmen, Iraque, Líbia, Líbano e Afeganistão) desde a migração de cerca de 7 mil pessoas fugindo da guerra na Síria (país endêmico para a forma cutânea da doença). Estima-se que somente no Líbano teve um aumento de 172 vezes (6 casos registrados entre 2010-2012, 1033 casos em 2013), sendo 97% diagnosticados em refugiados (STEVERDING, 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; KARAKUS, 2019).

Além da guerra, diversos outros fatores contribuem para expansão da doença, como: mudanças ambientais, desmatamento, turismo em regiões endêmicas, o aumento de pessoas em vulnerabilidade socioeconômica e a capacidade do vetor de se adaptar a ambientes urbanos e suburbanos, gerando novos padrões de transmissão (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Atualmente são descritos três perfis epidemiológicos para Américas:

- Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária, onde o homem, ao penetrar nesse ambiente, tornar-se um hospedeiro acidental (zoonose de animais silvestres);
- Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo;

c) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (BRASIL, 2017, p.24).

**Quadro 2:** Número de casos e incidência da leishmaniose no continente americano no ano de 2018

Países	Leishmaniose cutânea		Leishmaniose visceral	
	Casos	Incidência	Casos	Incidência
Américas	46041	18.91	3562	4.80
Bolívia	3127	54.71	-	-
Colômbia	6362	26.17	16	2.65
Equador	1237	10.26	-	-
Peru	6321	25.63	-	-
Venezuela	2612	10.32	43	1.64
Argentina	303	6.55	2	0.49
Paraguai	84	5.88	19	1.47
Brasil	16432	15.82	3466	5.05
Costa Rica	1247	26.81	-	-
El Salvador	50	12.59	3	1.16
Guatemala	1044	39.17	4	2.64
Honduras	1636	31.22	8	8.35
Nicarágua	3722	82.14	-	-
Panamá	1143	29.76	-	-
Guiana	27	21.51	-	-
Suriname	118	137.09	-	-
México	576	6.31	0	0
Uruguai	-	-	1	0.75

Fonte: Adaptado de OPAS, 2019<sup>b</sup>

O estabelecimento e manutenção desses perfis epidemiológicos ocorrem pela interação do inseto-vetor com o hospedeiro reservatório. Contudo, apesar do elevado número de espécies de mamíferos (cerca de 70 espécies) infectadas com *Leishmania*, poucas têm seu papel confirmado no ciclo biológico. Na maior parte do mundo, a leishmaniose é caracterizada como uma zoonose e seus possíveis reservatórios são animais com comportamento silvestre, sinantrópico ou doméstico, pertencentes às ordens: Didelphimorphia, Chiroptera, Carnivora, Rodentia, Pilosa e Hyracoidea. Entretanto no leste da África e na Ásia, em infecções causadas por *Leishmania (Leishmania) donovani* e

*Leishmania (Leishmania) tropica*, o principal reservatório é o homem (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; OMS, 2010; BRASIL, 2017; RIBEIRO et al., 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

No Brasil os reservatórios, identificados ou suspeitos, pertence às ordens Didelphimorphia, Primates, Carnivora, Rodentia, Pilosa e Cingulata. A espécie mais estudada é a *Canis familiaris* (cão doméstico), reservatório da *L. infantum*, pois habita o ambiente peridomiciliar e convive com o homem, facilitando a transmissão da leishmaniose visceral. Além do cão, o gato doméstico (*Felis Catus*) também pode ser infectado com a *L. infantum*, entretanto seu papel como reservatório ainda não é totalmente compreendido. As manifestações clínicas no cão e no gato são nomeadas como Leishmaniose canina e Leishmaniose felina, respectivamente (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; BRASIL, 2017; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

## 2.1. Ciclo Biológico

A *Leishmania* é um parasita obrigatório e heteroxênico, que necessita de dois hospedeiros (um artrópode e um vertebrado) para completar seu ciclo de vida. Em cada hospedeiro, o protozoário apresenta estágios do desenvolvimento diferentes, sendo o promastigota encontrado no intestino do hospedeiro artrópode, e a forma amastigota nas células do hospedeiro vertebrado. A forma promastigota tem como característica corpo celular alongado e elíptico, medindo cerca de 20 a 30 µm, possuindo na região anterior um longo flagelo, que lhe confere mobilidade (**Figura 4**). Já a forma amastigota possui corpo arredondado com flagelo vestigial, medindo cerca de 2 a 5 µm (**Figura 4**) (TEIXEIRA et al., 2013; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

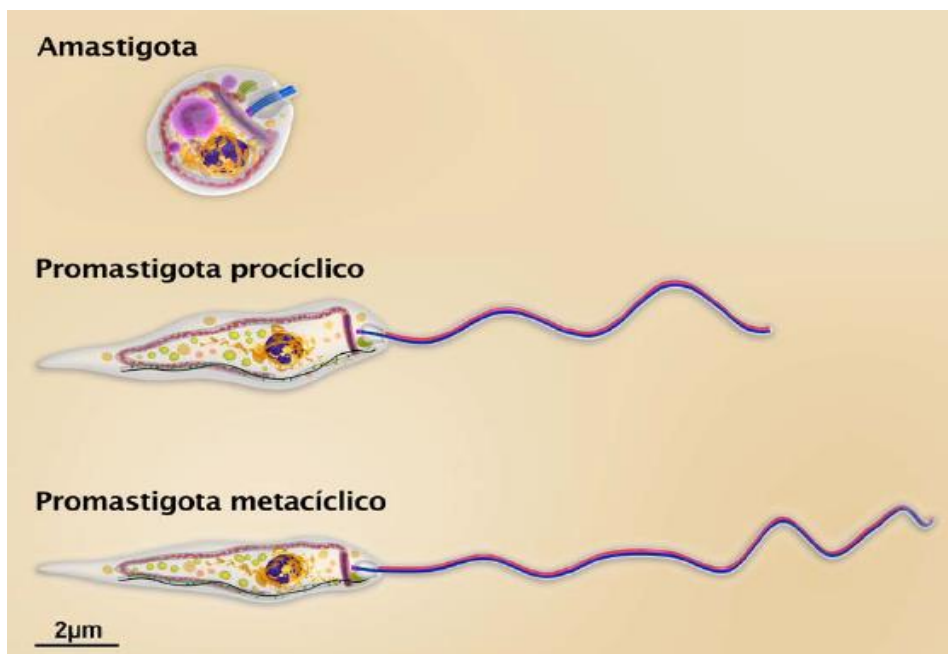
O hospedeiro artrópode e vetor da doença são dípteros pertencentes à subfamília Flebotominae, popularmente conhecidos como mosquito-palha, tatuquira e birigui, dependendo da localização geográfica. Esta subfamília se divide em seis gêneros, sendo três encontrados no Velho Mundo (*Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*) e três no Novo Mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*). Entre as 800 espécies conhecidas, 166 espécies foram descritas como possíveis vetores da leishmaniose, mas somente 78 espécies são comprovadamente vetores. Destas, 31 espécies pertencem ao gênero *Phlebotomus* e 47 espécies ao gênero *Lutzomyia* (AKHOUNDI et al, 2016, BRASIL, 2006<sup>a</sup>).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos com 4 estágios de vida (ovo, larva com 4 instares, pupa e adulto) que apresentam hábitos alimentares diferenciados em sua fase adulta, sendo somente as fêmeas hematófagas, pois o consumo de sangue é essencial para o desenvolvimento dos ovos. Dependendo da espécie, o repasto sanguíneo é realizado em diversos mamíferos, como canídeos, roedores, marsupiais e humanos (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; STEVERDING, 2017).

A infecção do vetor inicia quando a fêmea faz seu repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado e adquire macrófagos contendo formas amastigotas (**Figura 5- etapas 5 e 6**). No intestino médio o sangue adquirido, contendo macrófagos infectados, é envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células intestinais. Pimenta e colaboradores (1997 apud DI-BLASI, 2016) indicam que a matriz peritrófica auxilia na proteção do protozoário contra atividade enzimática durante essa etapa. Devido à ação digestiva, os macrófagos se rompem, liberando as amastigotas, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas (forma não infectante, mas proliferativa) (**Figura 5- etapa 7**). Ao fim da digestão, a matriz peritrófica se fragmenta, liberando as formas promastigotas procíclicas, que migram em direção ao epitélio, onde se fixam, através do flagelo, às microvilosidades e proliferam (**Figura 5- etapa 8**) (TEIXEIRA et al., 2013; DI-BLASI, 2016).

A colonização do epitélio intestinal ocorre em diferentes regiões dependendo do subgênero do protozoário. O subgênero *Viannia* coloniza as porções anterior e média do

intestino; enquanto o subgênero *Leishmania*, a porção anterior, média e posterior. Essa colonização ocorre através da interação do lipofosfoglicano (LPG), molécula de superfície presente na membrana externa da *Leishmania*, com as células intestinais do inseto (TEIXEIRA et al., 2013; DI-BLASI, 2016).



**Figura 4:** Esquema tridimensional dos estágios de desenvolvimento do protozoário *Leishmania*. Fonte: Teixeira et al., 2013

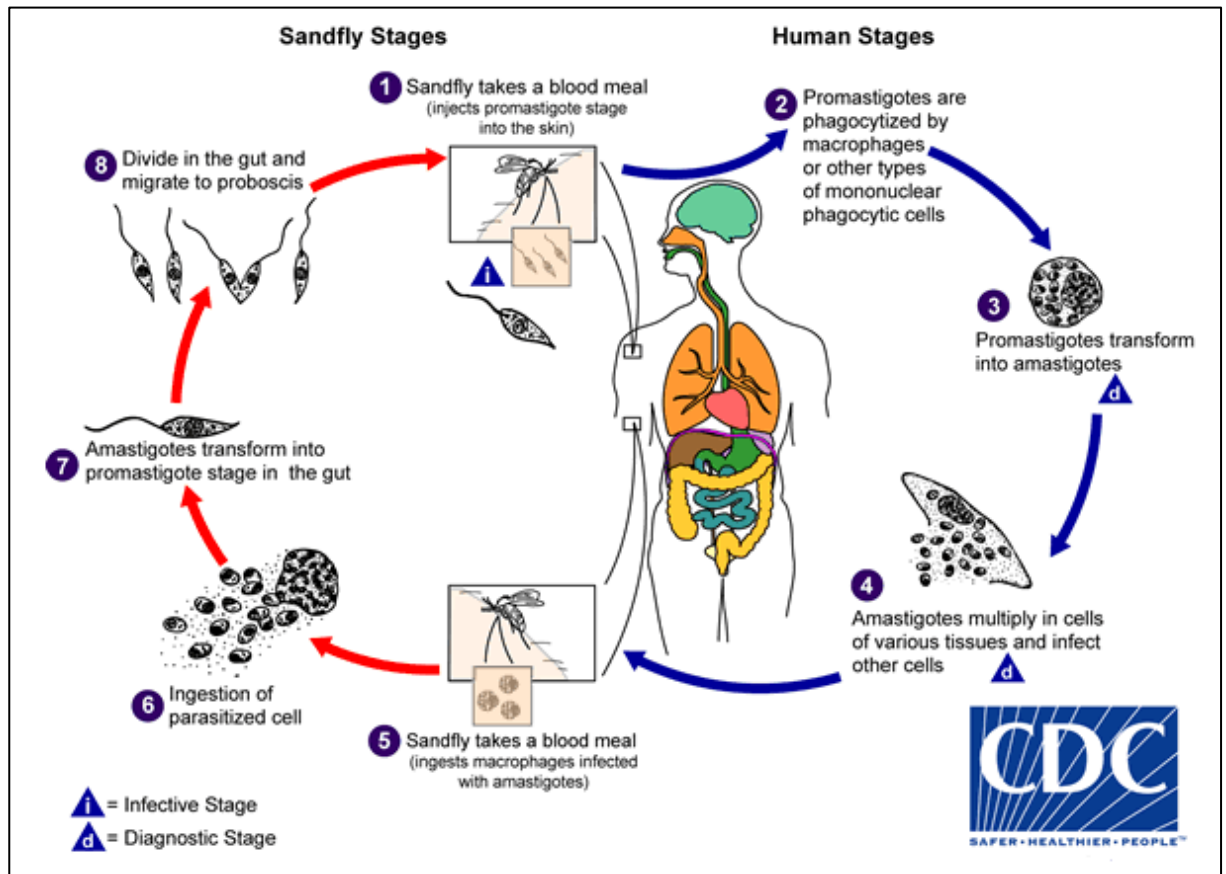
Após intensa proliferação, o parasito sofre metaciclogênese, processo de diferenciação em diferentes formas promastigotas com morfologia e aspectos bioquímicos distintos, até tornar-se infectante (forma metacíclica). Ao total, o parasito diferencia-se em 3 morfotipos, entre as formas procíclica e metacíclica, sendo nomeadas de nectomonas, leptomonas e haptomonas (**Figura 6**). As nectomonas são diferenciadas a partir das formas procíclicas; não proliferam e migram por quimiotaxia para a região anterior do intestino. Nessa região as nectomonas se diferenciam em leptomonas, uma forma com capacidade de proliferação e responsável pela produção do gel secretor de promastigota (PSG), rico em proteofosfoglicanos. O morfotipo haptomona não tem origem definida e é encontrado aderido ao epitélio da válvula estomodeal. Essa adesão, associada à secreção de quitinase, causa a destruição da válvula estomodeal, permitindo a migração das formas metacíclicas da região anterior do intestino, próximo à válvula estomodeal para a região da probóscide (ALTOÉ, 2013; SERAFIM, et al., 2018).

A forma infectante, metacíclica, é originada a partir da diferenciação do morfotipo leptomona. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que essa forma não se diferenciava, mas estudos de Serafim e colaboradores (2018) demonstraram que as formas metacíclicas se dediferenciam em formas leptomonas-like, nomeadas como retroleptomonas (**Figura 6**). As formas retroleptomonas são capazes de proliferar, e posteriormente, diferenciar-se em formas metacíclicas, aumentando a carga parasitária a ser inoculada no hospedeiro mamífero. Entretanto novos estudos biomoleculares são necessários para determinar se as retroleptomonas são realmente um novo morfotipo (SERAFIM, et al., 2018).

Segundo os autores, a dediferenciação é estimulada pelos nutrientes sanguíneos oriundos de um segundo repasto sanguíneo durante o ciclo de vida da *Leishmania* no inseto-

vetor. Estima-se que o ciclo completo do parasito no vetor ocorra de 4 a 18 dias, dependendo da espécie de *Leishmania* e de condições climáticas; e que o vetor necessite de um novo repasto sanguíneo a cada 5-6 dias (ALBERTOS-ALPUCHE, 1990; SERAFIM, et al., 2018).

A elevada carga parasitária na região anterior do intestino do vetor, associada à presença do PSG e a destruição da válvula estomodeal, dificulta a aquisição de sangue durante o repasto sanguíneo. Tais fatores promovem a regurgitação e inoculação de aproximadamente 10 a 200 metacíclicos no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (**Figura 5- etapa 1**) (TEIXEIRA et al., 2013; SERAFIM, et al., 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).



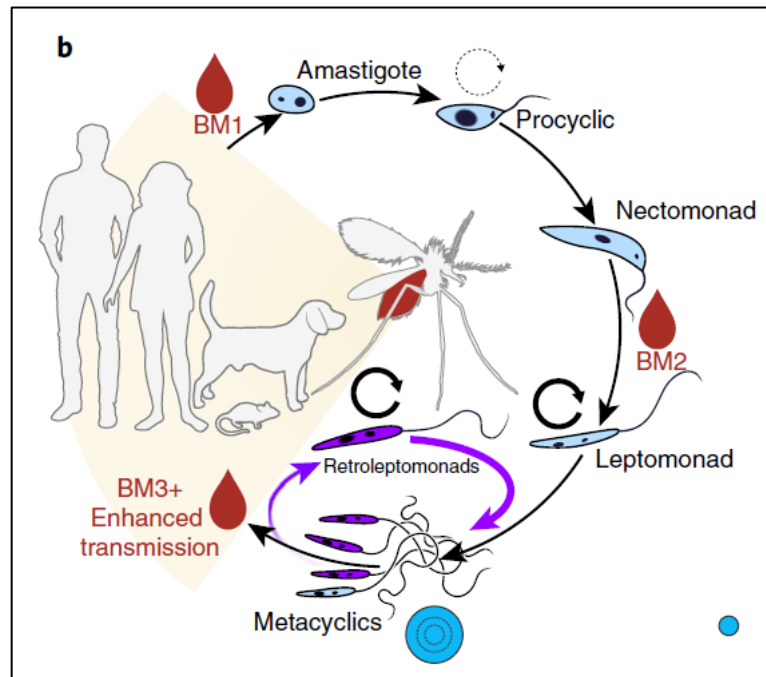
**Figura 5:** Ciclo biológico da *Leishmania*. Setas azuis demonstram as etapas do ciclo que ocorrem dentro do organismo do hospedeiro mamífero e setas vermelhas as etapas que ocorrem no interior do organismo do inseto-vetor. Fonte: CDC

No corpo do hospedeiro mamífero, as formas promastigotas metacíclicas são reconhecidas e fagocitadas, por células do sistema fagocitário, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, o parasito sofre diferenciação em formas amastigotas e começa a proliferar (**Figura 5- etapa 2 e 3**). A proliferação ocorrerá até todo o espaço citoplasmático da célula ser ocupado, provocando a sua lise (**Figura 5- etapa 4**). As formas amastigotas agora livres podem ser fagocitadas por novas células ou serem adquiridas por um novo vetor, fechando assim o ciclo biológico. O estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado pode variar de 15 dias a dois anos, tendo como média: dois a três meses (MUSKUS, MARÍN, 2002; CROFT, COOMBS, 2003, BRASIL, 2006<sup>a</sup>; TEIXEIRA et al., 2013; BRASIL, 2017).

Além do ciclo de transmissão clássica, descrito a cima, são encontradas na literatura vias de transmissões esporádicas. Essas transmissões não envolvem a presença do vetor e são relatadas para as espécies que apresentam viscerotropismo. Sendo elas: transmissão



placentária; transfusão sanguínea; transplante de órgãos e compartilhamento de objetos perfuro-cortantes (TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018).



**Figura 6:** Morfotipos forma promastigota de *Leishmania* durante a metaciclo genese. Fonte: SERAFIM, et al., 2018

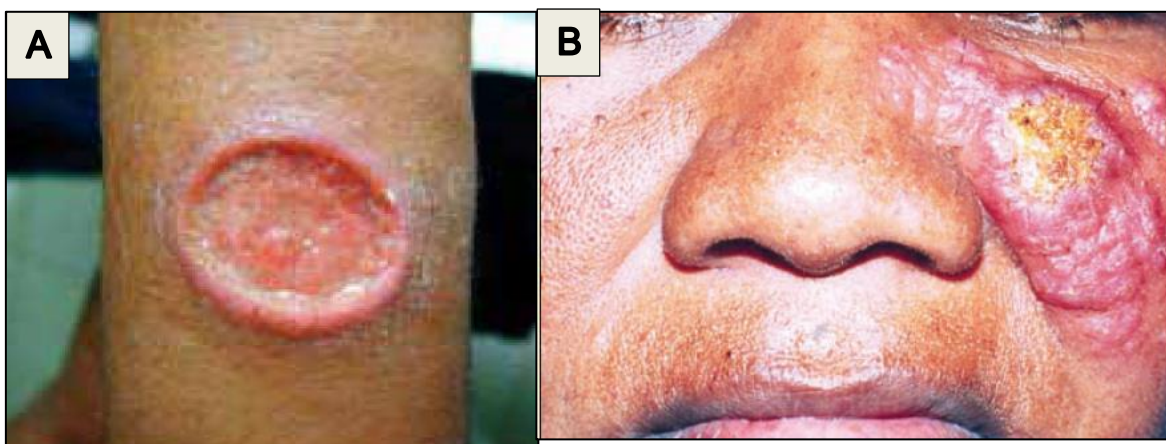
## 2.2. Formas Clínicas

A fisiopatologia da leishmaniose é caracterizada pela dinâmica entre os perfis Th1 e Th2 gerados por fatores intrínsecos à imunidade do hospedeiro, e a espécie de *Leishmania* que o está parasitando. Tal dinâmica é responsável por gerar um amplo espectro de manifestações clínicas que podem ser agrupadas em duas classes: leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral (TORRES-GUERRERO et al., 2017; KAYE E SCOTT, 2011 apud TEIXEIRA et al., 2013)

A leishmaniose tegumentar americana agrupa todas as formas clínicas que acometem a pele e/ou a mucosa. Podendo ser classificada, de acordo com a localização e evolução da lesão, em: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea atípica, e leishmaniose mucocutânea. Essas manifestações clínicas afligem pessoas de ambos os sexos e todas as idades, sendo predominantemente registradas em homens e maiores de 10 anos, representando respectivamente 70% e 94% dos casos ocorridos em 2018 nas Américas. (BRASIL, 2017; OPAS, 2019<sup>b</sup>).

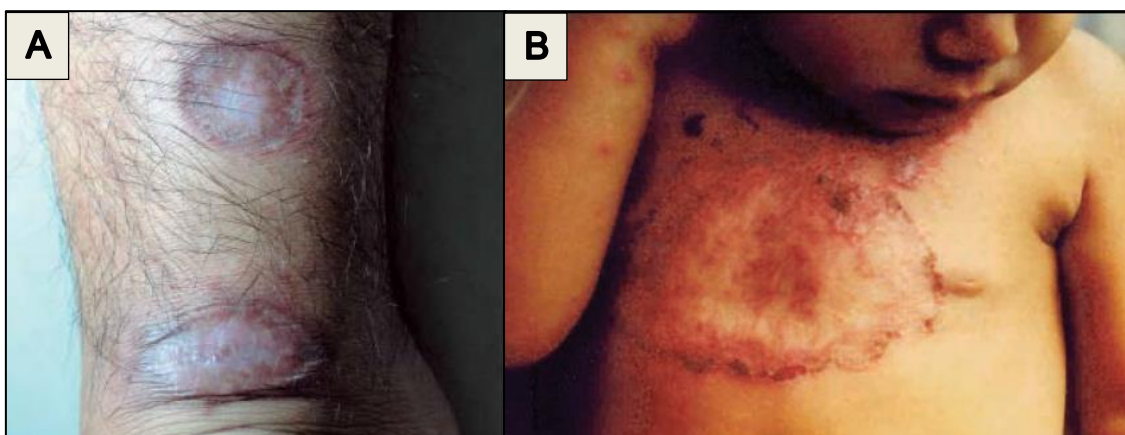
A leishmaniose cutânea localizada é a forma mais comum da doença, sendo causada por todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania* (**Quadro 1**). É caracterizada pelo aparecimento de lesões, únicas ou múltiplas (até 20 lesões), em regiões expostas da pele, normalmente rosto e membros. As lesões surgem no local da picada do inseto-vetor, inicialmente como uma protuberância sólida (pápula), arredondada e indolor que expande progressivamente até ulcerar. A úlcera típica é indolor, de formato arredondado ou ovalado

com bordas bem delimitadas e altas, fundo granuloso com coloração avermelhada podendo ser recoberta por uma crosta ou pseudomembrana esbranquiçada (**Figura 7-A**). No Velho Mundo as lesões podem se apresentar como hiperqueratose ou placas semelhantes a verrugas (**Figura 7-B**). O aspecto inicial das lesões pode ser alterado devido às infecções secundárias causadas por agentes microbianos, principalmente bactérias, apresentando aparência purulenta e causando dor ao paciente (BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; OPAS,2019<sup>a</sup>).



**Figura 7:** Pacientes apresentando lesões de leishmaniose cutânea. A: Lesão ulcerada típica com bordas arredondadas e elevadas. B: Lesão com aspecto verrugoso. Fonte: BRASIL, 2006<sup>b</sup>, 2017.

A leishmaniose cutânea localizada pode evoluir naturalmente para cura espontânea, dentro de alguns meses, ou torna-se crônica, permanecendo ativa por muitos anos. As lesões que evoluem para cura espontânea exibem uma cicatrização atrófica com superfície lisa e delgada de coloração pálida a rosada, podendo em alguns casos apresentar colorido natural da pele (**Figura 8- A**). Em alguns pacientes (33%) somente a área central cicatriza, mantendo as bordas ativas, sendo chamado de recidivas cútis (**Figura 8 – B**). Essas cicatrizes provocam grande estigma social, principalmente em mulheres e crianças, causando isolamento, evasão escolar e perda econômica (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; BRASIL, 2006<sup>b</sup>; TORRES-GUERRERO et al., 2017; OPAS,2019<sup>a</sup>; DNDi, 2019<sup>b</sup>).



**Figura 8:** Cicatrizes das lesões causadas pela leishmaniose cutânea. A: Cicatrizes atróficas. B: Recidivas cútis - lesão com área central cicatrizada e bordas infiltradas. Fonte: BRASIL, 2006<sup>b</sup> e OPAS,2019<sup>a</sup>

A forma clínica cutânea disseminada é pouco frequente, sendo observada em somente 2% dos casos. É caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões em diversas regiões do corpo, principalmente tronco e rosto. As lesões possuem diversos tamanhos, mas a maioria é pequena, com formato papular, semelhante à acne, podendo ser ulcerada (**Figura 9**). O aparecimento dessas lesões está associado ao mecanismo de disseminação do parasito pelo sistema circulatório, estabelecendo-se em sítios distantes do local da picada. No continente americano essa forma clínica é causada por cinco espécies (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana*) e no Brasil pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (BRASIL, 2006<sup>b</sup>; BRASIL, 2017; OPAS,2019<sup>a</sup>).



**Figura 9:** Paciente apresentando lesões acneiformes de leishmaniose cutânea disseminada. Fonte: OPAS,2019<sup>a</sup>

A leishmaniose cutânea atípica também é uma forma pouco frequente, relatada na América Central (Nicarágua, Honduras, Costa Rica e El Salvador) e Venezuela. Caracteriza-se pela presença de lesões nodulares, não ulceradas e crônicas, causada pela espécie *L. infantum* (sinonímia *L. chagasi*) (**Figura 10**) (OPAS,2019<sup>a</sup>).

A leishmaniose cutânea difusa é uma manifestação clínica rara e grave que acomete pacientes com deficiência na resposta imune celular específica aos antígenos da *Leishmania*. São descritos cerca de 350 casos, até o ano de 2006, nos continentes africano (Etiópia e Quênia) e americano (México, República Dominicana, Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela). A maioria dos casos relatados ocorre durante a primeira infância, sugerindo que a ausência de uma imunidade específica poderia ser causada pela imaturidade do sistema imunológico. A anergia também pode ser causada por outros fatores inerentes ao hospedeiro ou por efeito direto do parasito (BRASIL, 2006<sup>b</sup>; BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

As espécies implicadas na leishmaniose difusa são: *L. venezuelensis*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, esta última

é a única espécie responsável por esse quadro no Brasil. A evolução da manifestação clínica se dá pelo surgimento de uma única lesão papular com evolução progressiva e lenta, com o tempo o parasito migra dessa lesão através da linfa e dos vasos sanguíneos, para outras regiões do organismo, formando novas lesões não ulceradas (**Figura 11**) (BRASIL, 2006<sup>b</sup>; BRASIL, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).



**Figura 10:** Paciente apresentando lesão de leishmaniose atípica. Fonte: OPAS,2019<sup>a</sup>



**Figura 11:** Paciente apresentando lesões de leishmaniose cutânea difusa. Fonte: Torres-Guerrero et al., 2017

Na leishmaniose mucocutânea, os pacientes apresentam lesões destrutivas localizadas nas mucosas, principalmente do trato respiratório superior (faringe, laringe, boca e nariz), excepcionalmente afetando a garganta, traqueia e brônquios (**Figura 12**). As lesões da laringe podem gerar disфонia e perda da capacidade de comunicação em 5 a 15% dos pacientes, enquanto as lesões na região da boca e nariz causam mutilações devido à destruição do septo nasal e do palato. Essa manifestação clínica é decorrente de uma metástase do tecido e pode ser classificada com base no local e tempo decorrido para o surgimento dos sintomas (BRASIL, 2017; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

As lesões são classificadas como:

- a) Forma mucosa tardia: forma mais clássica da leishmaniose mucocutânea. É caracterizada pelo aparecimento de lesões na mucosa, anos após a cura clínica de uma leishmaniose cutânea localizada. Estima-se que 90% dos casos ocorram dentro de dez anos e 50% nos dois primeiros anos;
- b) Forma mucosa concomitante: o aparecimento das lesões na mucosa se dá no mesmo período de uma lesão localizada;
- c) Forma mucosa contígua: quando a lesão cutânea pré-existente está localizada próxima à mucosa, e devido ao seu crescimento, a invade;
- d) Forma mucosa primária: quando a lesão é causada pela picada do inseto-vetor diretamente na mucosa. Esse tipo de lesão é restrito as mucosas orais e genitais.
- e) Forma mucosa indeterminada ou prévia primária: em 15% dos pacientes não é possível identificar nenhuma lesão cutânea prévia ao surgimento das lesões nas mucosas. Acredita-se que esse quadro esteja associado a lesões cutâneas pequenas de evolução rápida e que não deixam cicatrizes perceptíveis (BRASIL, 2006<sup>b</sup>).



**Figura 12:** Paciente apresentando destruição da mucosa oronasal devido à lesão causada pela leishmaniose mucocutânea. Fonte: BRASIL, 2006<sup>b</sup>

A leishmaniose mucocutânea é restrita a América Latina, sendo principalmente causada pela *L. braziliensis*. Três países (Bolívia, Peru e Brasil) apresentam uma alta incidência de casos, representando 90% dos relatos mundiais. Somente no Brasil, o número de casos notificados corresponde 3-6% do número total de casos de leishmaniose, podendo chegar a 25% dos casos em municípios endêmicos. A taxa de óbito é de 1% dos casos relatados e são decorrentes de asfixia, pneumonia por broncoaspiração ou infecções secundárias (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; BRASIL, 2006<sup>b</sup>; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar ou “black fever”, é a forma mais grave da doença, podendo levar a morte se não for rapidamente diagnosticada e tratada. É causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (sinonímia *L. chagasi*), que apresentam acentuado tropismo pelas vísceras (fígado, baço, linfonodos e medula óssea), causando um quadro severo de linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia (aumento do volume dos linfonodos, fígado e baço, respectivamente), febre e anemia (**Figura 13**). O quadro de acentuada anemia associada à leucopenia é o principal causador de hemorragias e susceptibilidade a infecções secundárias que levam o paciente a óbito. Essa sintomatologia

clássica pode estar ausente em grande parte da população infectada de áreas endêmicas, estimando-se que a soroprevalência de pessoas assintomáticas seja de 7-63% do total de casos no subcontinente Indiano e 29-34% do total de casos no Brasil (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; DNDi, 2019<sup>a</sup>; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

A leishmaniose visceral afeta principalmente crianças menores de cinco anos, correspondendo a 50% dos casos reportados pelo Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia. Somente no Brasil, no ano de 2018, foram relatos 1075 dos casos (31%) nessa faixa etária. Acredita-se que o elevado número de casos dessa faixa etária esteja associado a aspectos nutricionais (DNDi, 2019<sup>a</sup>; OPAS, 2019<sup>a</sup>; OPAS, 2019<sup>b</sup>).

Outro grupo de risco para leishmaniose visceral são pessoas imunossuprimidas, principalmente as que possuem a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Essa condição é reportada por 36 países e representa 6% dos casos reportados no Brasil e na Índia, e 18% dos casos relatados na Etiópia. Na coinfeção HIV-leishmaniose, a diminuição da população de linfócitos T CD4+ gerada pela SIDA acarreta o aumento da disseminação e proliferação da *Leishmania*, acentuando a gravidade dos sintomas e risco de óbito (BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; DNDi, 2019<sup>a</sup>; OPAS, 2019<sup>a</sup>; DNDi - site).

A espécie *L. donovani* pode causar uma complicação da leishmaniose visceral, chamada de leishmaniose dérmica pós-calazar. Essa condição surge nos três primeiros anos após o tratamento da leishmaniose visceral, devido à resposta imune do hospedeiro a parasitos residuais. Representa 5-10% dos casos relatados na Ásia e 50% dos casos da África oriental. Nessa variante da leishmaniose, os pacientes apresentam máculas hipopigmentadas (**Figura 14-B**), pápulas eritematosas ou erupções nodulosas localizadas no rosto, tronco ou em todo o corpo (**Figura 14-A**). Normalmente as lesões, apresentam cura espontânea dentro de um ano. (ZULFIQAR, SHELPER, AVERY, 2017; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; DNDi, 2019<sup>a</sup>)



**Figura 13:** Paciente com leishmaniose visceral apresentando hepatoesplenomegalia. Fonte: Brasil, 2006



**Figura 14:** Pacientes apresentando lesões causadas pela leishmaniose dérmica pós-calazar. A: erupções nodulosas. B: máculas hipopigmentadas. Fonte: BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018

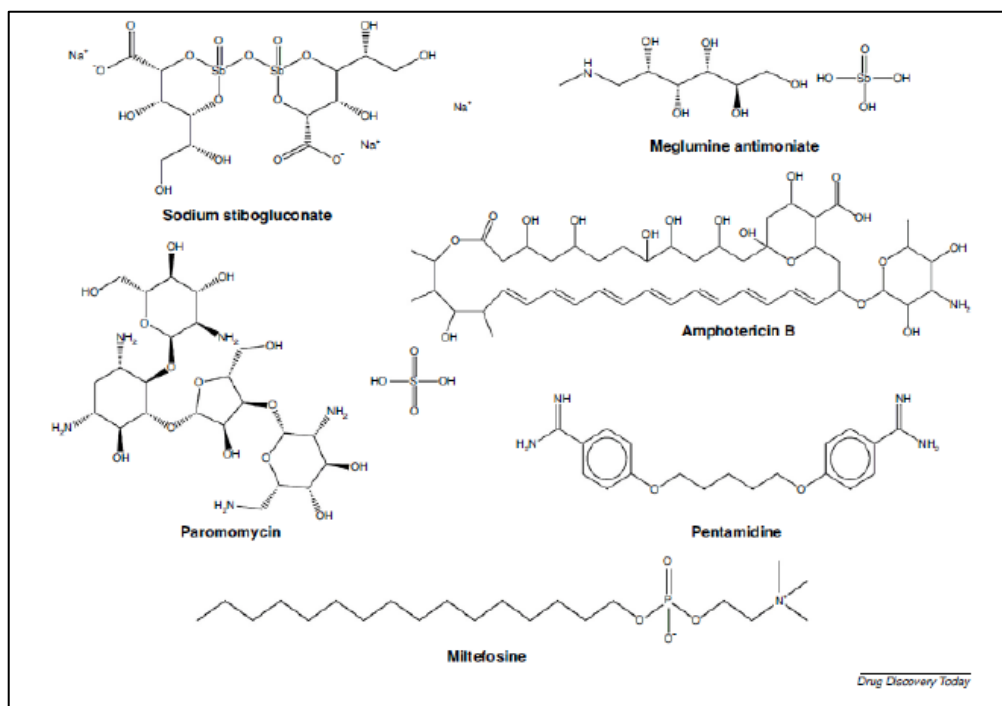
### 2.3. Tratamento

As leishmanioses apresentam diversos esquemas terapêuticos que variam conforme a forma clínica da doença; a espécie causadora; a idade, sexo e estado clínico do paciente; a presença de coinfeções e/ou doenças oportunistas; e a região geográfica. O tratamento pode ser realizado de forma local, através de tratamentos térmicos ou administração intradérmica; ou de forma sistêmica, por monoterapias ou terapias combinadas. Os principais fármacos utilizados nesses esquemas terapêuticos são: antimoniais, anfotericina B e suas formulações lipossomais, pentamidina, azóis, paromomicina e miltefosina (**Figura 15**) (OPAS, 2019<sup>a</sup>).

Os antimoniais foram os primeiros fármacos introduzidos para o tratamento da leishmaniose. Seu primeiro registro data de 1912, quando o pesquisador brasileiro Gaspar Vianna relatou a cura de pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea após serem tratados com injeções intravenosas de 10 mg de tártaro emético (antimoniais trivalentes). Dois anos depois Castellani, Di Cristina e Caronia, e Rogers relataram resultados promissores de pacientes com leishmaniose visceral tratados com o tártaro emético. Entretanto esse medicamento apresentava diversos efeitos colaterais, como dores no peito e depressão, e na década de 40 foram introduzidas formulações menos tóxicas de antimônio chamadas de antimoniais pentavalentes (VIANNA, 1912; LOW, et al 1916; HALDAR, SEN, ROY, 2011).

Os antimonias pentavalentes são utilizados para o tratamento de todas as formas clínicas de leishmaniose, sendo comercializados dois fármacos, com eficácia terapêutica semelhante: o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e o antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), mas apenas esta última está disponível no Brasil. O mecanismo de ação destes compostos no organismo é, até hoje, pouco compreendido, mas acredita-se que atuam sobre o metabolismo oxidativo, pela inibição da enzima tripanotona redutase; no metabolismo glicolítico e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos; na inibição da DNA topoisomerase I de formas

amastigotas e na modulação de células imunes. (CROFT, COOMBS, 2003; BRASIL, 2006<sup>a</sup>; HALDAR, SEN, ROY, 2011).



**Figura 15:** Fórmula química dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. Fonte: Zulfiqar, Shelper, Avery, 2017.

No tratamento das manifestações tegumentares, os antimoniais pentavalentes podem ser administrados de forma sistêmica, por via endovenosa ou intramuscular, ou de forma subcutânea. A escolha da via de aplicação depende da quantidade de lesões e suas localizações, sendo o tratamento intralesional restrito a paciente com lesões únicas localizadas nos membros ou troncos. O regime de dose recomendado, para a via intradérmica, é de 1-5 ml por sessão, ocorrendo 1 a 5 infiltrações com intervalo de 3 a 7 dias, enquanto na via sistêmica se recomenda 10 a 20 mg de  $Sb^{+5}/Kg/dia$  durante 20 dias, sendo na forma mucocutânea utilizada a dosagem máxima (20 mg de  $Sb^{+5}/Kg/dia$ ) durante 30 dias, preferencialmente associado ao uso de pentoxifilina (400mg/ 3 vezes ao dia), um vasodilatador com ação inibitória na produção de  $TNF-\alpha$  (TORRES-GUERRERO et al., 2017; BRASIL, 2017; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

O uso da pentoxifilina é restrito há maiores de 12 anos, enquanto os antimoniais são contraindicados para idosos, grávidas e portadores de doenças cardíacas, renais ou hepatológicas. Essa contraindicação deve-se aos efeitos colaterais do fármaco que provoca distúrbio de repolarização cardíaca, insuficiência renal aguda, elevação das enzimas hepáticas, teratogenicidade e embriotoxicidade (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BRASIL, 2017).

O uso de monoterapia de antimonial pentavalente no tratamento da leishmaniose visceral não é recomendado em regiões endêmicas da África e Ásia devido ao surgimento de cepas resistentes. Somente na Índia, no estado de Bihar, foram relatados 65% de casos resistentes ao tratamento. Na África é recomendado a combinação de terapia de estibogluconato de sódio (20 mg de  $Sb^{+5}/Kg/dia$ ) associado a paromomicina intramuscular (15mg/kg) durante 17 dias. Na América é adotada a monoterapia, sendo recomendado 20 mg de  $Sb^{+5}/Kg/dia$  durante 20-40 dias. A contraindicação e efeitos adversos dos antimoniais são



os mesmos relatados durante o tratamento das manifestações cutâneas (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; SEIFERT, CROFT, 2006; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica introduzido na década de 60 como alternativa para o tratamento da leishmaniose, devido a sua interação com esteróis (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática das formas amastigotas e promastigotas do parasito. A interação esteróis-anfotericina B leva a formação de poros na membrana do parasito, causando um desbalanceamento iônico, estresse oxidativo e morte celular (CROFT, COOMBS, 2003; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

A anfotericina B é indicada para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral. Entretanto no Brasil, esse fármaco não é recomendado para o tratamento de lesões cutâneas sendo somente utilizado em pacientes imunossuprimidos ou gestantes. A dose recomendada é de 1 mg/kg/dia administrado por via endovenosa através de infusão lenta (4 a 6 horas de administração), tanto para a forma visceral, quanto para a cutânea, alterando somente o período de tratamento. A infusão quando realizada de forma rápida (menos de 1 hora) provoca alterações cardíacas, podendo levar o paciente a óbito. O principal efeito colateral são complicações renais, que ocorrem em quase todos os pacientes e são causadas pela vasoconstrição renal (CROFT, COOMBS, 2003; BRASIL, 2006<sup>a</sup>; BRASIL, 2017).

Na década de 80, na tentativa de reduzir os efeitos adversos foram criadas as formulações lipídicas: anfotericina B lipossomal (AmBisome<sup>®</sup>), complexo lipídico de anfotericina B e dispersão coloidal de anfotericina B. Somente a formulação AmBisome<sup>®</sup> é aprovada para uso pela “Food and Drug Administration” (FDA), e a dose recomendada para tratamento da leishmaniose visceral varia por região, pois as cepas da Índia são mais susceptíveis que de outras regiões do mundo. Por tal razão, desde 2010 a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda uma única dose de 10 mg/kg no subcontinente Indiano. Nos demais países indica-se à administração de 3-5 mg/kg/dose até atingir a dose máxima de 20 mg/kg (CROFT, COOMBS, 2003; CROFT, OLLIARO, 2011; CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

A pentamidina é um composto pertencente às diaminas aromáticas, introduzido na década de 50 para o tratamento da leishmaniose cutânea e difusa. Somente na década de 80 começou a ser utilizado como medicamento de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose visceral com taxas de curas maiores que 95% na Índia. Entretanto sua toxicidade é maior que seus benefícios e por tal razão seu uso foi limitado em alguns países. Os efeitos colaterais principais são alterações glicêmicas (hipoglicemia e hiperglicemia) e pancreatite, causada pela toxicidade a células  $\beta$ -pancreáticas, que em longo prazo provocam o aparecimento de diabetes *mellitus* em 10-15% dos pacientes (CROFT, COOMBS, 2003; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; TORRES-GUERRERO et al., 2017; BRASIL, 2017).

Atualmente, a pentamidina é indicada como o tratamento de primeira escolha da leishmaniose cutânea difusa e das formas clínicas causadas pela espécie *L. guyanensis*, nas Américas. Recomenda-se a administração intramuscular ou endovenosa lenta de 3-4 mg/kg/dia em dias alternados, durante uma semana. Seu uso também é indicado para o tratamento profilático de pacientes imunossuprimidos com leishmaniose visceral na Etiópia. O intuito do tratamento profilático é reduzir o surgimento de formas recidivas da doença. Sendo recomendada a administração de uma dose mensal de 4 mg/kg durante um ano (BRASIL, 2017; CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

Os azóis são antifúngicos que apresentam atividade bloqueadora sobre a síntese de ergosterol. As formulações cetoconazol, itraconazol e fluconazol são amplamente estudadas, entretanto somente o cetoconazol é recomendado pela OMS para o tratamento das leishmanioses produzidas por *L. mexicana* e *L. panamensis* no Novo Mundo. Sendo

administrados 600 mg/dia durante 28 dias (CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

A paromomicina, também conhecida como aminosidina ou monomicina, é um antibiótico aminoglicosídeo produzido pela bactéria *Streptomyces rimosus*. Seu mecanismo de ação está relacionado à interação com a mitocôndria e a subunidade ribossomal 30s, provocando a inibição da atividade respiratória e da síntese proteica, respectivamente. Seus efeitos anti-*Leishmania* foram descobertos na década de 60 e desde 2006 é registrada para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia. Recomenda-se a administração intramuscular de 15 mg/kg durante 21 dias. O uso deste composto em outras regiões apresenta eficácia variável e menor que as relatadas na Índia. No continente africano os melhores parâmetros são apresentados pelo Sudão, com 80% de cura utilizando um regime de dose de 20 mg/kg por 21 dias, ou 15 mg/kg por 28 dias. O uso da paromomicina no tratamento da leishmaniose cutânea é recomendado somente no Velho Mundo, sendo administrado de forma tópica nas doses: 15% de paromomicina associado a 12% de cloreto de metil-benzetônico, ou 10% ureia, ou 0,5% de gentamicina (CROFT, COOMBS, 2003; SEIFERT, CROFT, 2006; CROFT, OLLIARO, 2011; BURZA, CROFT, BOELAERT, 2018; CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019).

A miltefosina, único fármaco oral disponível para o tratamento da leishmaniose, é uma hexadecilfosfocolina originalmente desenvolvida para o tratamento do câncer, que teve sua atividade anti-*Leishmania* descoberta na década de 80. Seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido, mas acredita-se que atue na biossíntese da fosfatidilcolina, na transdução de sinal e homeostase do cálcio. Seu primeiro registro ocorreu na Índia em 2002, e em 2005 foi recomendada como medicamento de primeira escolha no programa de Eliminação da Leishmaniose Visceral na Índia, Nepal e Bangladesh. Entretanto após uma década de uso, relatos de resistência aumentaram consideravelmente obrigando o programa a limitar o seu uso. Atualmente, diversos estudos buscam melhorar a eficácia da miltefosina, associando seu tratamento a outros medicamentos como paromomicina e anfotericina B lipossomal. Em um estudo de fase IV realizado na Índia, as terapias combinadas miltefosina + paromomicina e miltefosina + AmBisome<sup>®</sup> apresentaram taxa de cura (97% e 89%, respectivamente) semelhante à droga de escolha, anfotericina B lipossomal (91,4% de cura) (CROFT, COOMBS, 2003; SEIFERT, CROFT, 2006; CROFT, OLLIARO, 2011; CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2019).

A miltefosina é pouco utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea, mas desde 2013 seu uso é recomendado pela OPAS para o tratamento da leishmaniose cutânea provocada por *L. guyanensis* e *L. panamensis*. É indicado o uso de 1,5 – 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias, sendo ingerido após a alimentação para reduzir os efeitos adversos gastrointestinais. Além desse malefício, a única desvantagem do uso da miltefosina é a sua ação teratogênica que limita seu uso por gestantes ou mulheres em idade reprodutiva (CROFT, COOMBS, 2003; CROFT, OLLIARO, 2011; DNDi, 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

No Brasil, a miltefosina encontra-se em fase de teste e não possui registro de uso aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apesar da recomendação de uso da OPAS, da deliberação de 2010 da Comissão de Incorporação de Tecnologias do Ministério da Saúde (CITEC) e do relatório de recomendação de 2016 da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC), sugerindo o registro da miltefosina e sua incorporação no SUS. Entretanto desde 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o uso da miltefosina, sob o nome comercial de Milteforan<sup>®</sup>, para o tratamento da leishmaniose canina (FIOCRUZ, 2015; CONITEC, 2016, MAPA, 2016).

#### **2.4. Leishmaniose e sua Importância Veterinária**

O parasita *Leishmania* é capaz de infectar diversas espécies de mamíferos, entretanto a participação desses hospedeiros no ciclo epidemiológico da doença não é bem compreendida. Diversos animais com hábitos sinantrópicos e domésticos são os principais referidos como possíveis hospedeiros. Dentre esses os mais estudados são os animais de companhia, cão e gato domésticos, devido a sua íntima relação com os humanos.

#### 2.4.1. Leishmaniose felina

Gatos são historicamente considerados resistentes à leishmaniose, contudo casos são descritos na Europa e na América do Sul. A ocorrência da doença é considerada esporádica, entretanto em regiões endêmicas, com episódios de leishmaniose canina, casos são considerados comuns, apresentando uma prevalência de até 60%. A doença é causada pela infecção de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, e *L. infantum*, sendo essa última a mais relatada (PENNISI et al, 2013; PENNISI et al, 2015; ASFARAM, FAKHAR, TESHNIZI, 2019).

A leishmaniose felina é descrita em gatos com pelagem curta de todas as idades e sexo. Sintomas clínicos nem sempre estão presentes, sendo associados a animais com Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (PENNISI et al, 2013; PENNISI et al, 2015).

Os sintomas da leishmaniose felina incluem linfadenomegalia, esplenomegalia, alopecia, gengivoestomatites, lesões oculares e tegumentares, que podem ser ulceradas, nodulares ou escamosas. As lesões cutâneas (**Figura 16**) são os únicos sintomas encontrados na avaliação clínica, sendo relatados em 50% dos casos (PENNISI et al, 2013; PENNISI et al, 2015; RIBEIRO et al., 2018; ASFARAM, FAKHAR, TESHNIZI, 2019).



**Figura 16:** Lesão ulcerativa em gato causada pela *Leishmania infantum*. Fonte: PENNISI et al, 2013

O tratamento é realizado utilizando o fármaco alopurinol, uma purina análoga que atua como inibidor da síntese de purinas. É recomendando a administração via oral de 10-20 mg/kg a cada 12 ou 24h. A cura clínica é observada dentro de semanas a 6 meses (PENNISI et al, 2013; PENNISI et al, 2015).

### 2.4.2. Leishmaniose canina

O termo leishmaniose canina, na literatura, está intimamente relacionado à leishmaniose visceral canina causada pela infecção da *L. infantum*, mas relatos de cães infectados com espécies dermatrópicas (*Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*) são comuns. Entretanto o papel do cão no ciclo epidemiológico dessas espécies dermatrópicas ainda não é totalmente compreendido. Alguns pesquisadores defendem o cão como reservatório da *L. braziliensis*, enquanto outros estudos demonstram que sua influência no ciclo epidemiológico é pouco relevante (MARCONDES, DAY, 2019).

A leishmaniose cutânea canina é relatada em países da América do Sul, tendo uma prevalência de 3,2-50,3% dependendo da região e método de diagnóstico utilizado. Na Argentina em regiões endêmicas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em humanos, a taxa de prevalência de leishmaniose cutânea canina foi de 27,4%, sendo 22,7% desses animais soropositivos e 13,5% clinicamente doentes (MARCONDES, DAY, 2019).

A leishmaniose visceral canina é endêmica em 70 países com uma população de 2,5 milhões de animais afetados. Nos últimos anos tem se observado uma expansão da doença em regiões ao norte do Mediterrâneo (região endêmica para a doença) e ao sul da América, sendo relatados novos focos da doença na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. Somente no Paraguai na cidade de Assunção, a prevalência de animais com leishmaniose canina aumentou de 3,1-11,8% em 1999 para 69% em 2010. Estima-se que áreas endêmicas tenha prevalência de até 60% de animais infectados (KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; DANTAS-TORRES et al, 2018).

As manifestações clínicas de ambas as leishmanioses caninas são semelhantes, com pequenas variações. No geral, a infecção pode apresentar ou não um quadro clínico, sendo animais classificados como: sintomáticos (apresenta pelo menos três sintomas), oligosintomáticos (apresenta somente uma manifestação clínica, geralmente adenopatia linfóide) e assintomáticos. Cães assintomáticos representam 50-60% da população canina infectada e são fontes de alimentação, altamente infecciosas, para o vetor (RIBEIRO et al., 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>; MARCONDES, DAY, 2019).

Os principais sintomas da leishmaniose canina são lesões cutâneas, lesões articulares, ceratoconjuntivite, alopecia, onicogribose (**Figura 17-A**), linfadenomegalia e lesões renais, sendo essa última responsável por ocasionar óbitos. Além desses sintomas, a esplenomegalia está presente nos casos de leishmaniose visceral canina. As lesões cutâneas são encontradas em 90% dos animais sintomáticos e podem apresentar-se como lesões ulceradas (**Figura 17-B**), descamativas, nodulares (**Figura 17-C**) ou papulares nas regiões das orelhas e focinho (KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; RIBEIRO et al., 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>; MARCONDES, DAY, 2019).

O amplo espectro de sinais clínicos é ocasionado por diferenças na resposta imunológica de cada indivíduo, entretanto esse mecanismo imune ainda não é bem compreendido. Acredita-se que variações no *background* genético ocasionadas pela expressão do gene *Slc11a1* e pelo polimorfismo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II tornem as raças (Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e German Shepherd) susceptíveis, enquanto uma resposta imune predominantemente celular torne as raças (Ibizan Hound) resistentes. Além desses fatores, a idade influencia na susceptibilidade do animal, sendo filhotes mais sensíveis à infecção que os adultos (KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; RIBEIRO et al., 2018).

O tratamento de cães sintomáticos, oligosintomáticos e assintomáticos soropositivos, é recomendado, e realizado pela administração de monoterapias ou terapias combinadas dos

fármacos: antimoniais pentavalentes, anfotericina B e suas formulações lipídicas, paranomocina, miltefosina e alopurinol (descrito em mais detalhes no item 2.5 desse trabalho). (OLIVA et al, 2010; KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; DANTAS-TORRES et al, 2018; RIBEIRO et al., 2018).



**Figura 17:** Manifestações clínicas da leishmaniose canina. A: onicogribose. B: lesão ulcerativa no focinho. C: lesão nodular no focinho. Fonte: BRASIL, 2006<sup>a</sup>; KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015 BRASIL, 2017.

A terapia combinada de antimoniais pentavalentes administrados por via subcutânea (100mg/kg) durante 1 mês associado ao uso de 10 mg/kg de alopurinol durante 6 meses, é o protocolo terapêutico mais utilizado. Entretanto a FDA não recomenda a utilização de antimoniais pentavalentes em animais. Os outros esquemas terapêuticos são:

- a) Paranomocina + antimonial pentavalente: administrar 5 mg/kg de paranomocina por via subcutânea por 3 semanas associado a 60 mg/kg de antimonial pentavalente por via intramuscular a cada 12 horas durante 4 semanas;
- b) Monoterapia de miltefosina: administrar uma dose diária de 2 mg/kg durante 28 dias;
- c) Miltefosina + alopurinol: administrar 2 mg/kg de miltefosina durante 28 dias associado a 10 mg/kg de alopurinol a cada 12 horas durante vários meses. (OLIVA et al, 2010)

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) proíbe o uso de medicamentos para tratamento humano no tratamento veterinário desde 2008. Nesse período a recomendação do país era a eutanásia dos animais, uma vez que evidências científicas demonstravam que o tratamento só levava a uma cura clínica e redução da carga parasitária, permitindo que o animal continua-se sendo uma fonte de infecção para o vetor. Entretanto, Dantas-torres e colaboradores (2018) salientam que apesar da eutanásia de 15 mil animais entre 1993 e 1997 em Belo Horizonte - MG, 169 casos humanos de leishmaniose visceral, com 17 pacientes vindo a óbito, ocorreram no mesmo período e local. Tais indicadores demonstram uma ineficiência na metodologia de controle e corrobora outras evidências da literatura. Apesar disso, a recomendação do MS para eutanásia dos animais se mantém até os dias atuais (BRASIL, 2006<sup>a</sup>; DANTAS-TORRES et al, 2018; MARCONDES, DAY, 2019).

Contudo desde 2016, o MS junto ao MAPA através da Nota Técnica Conjunta nº 001 de 2016, autorizaram o registro e a utilização do Milteforan® (medicamento cujo princípio

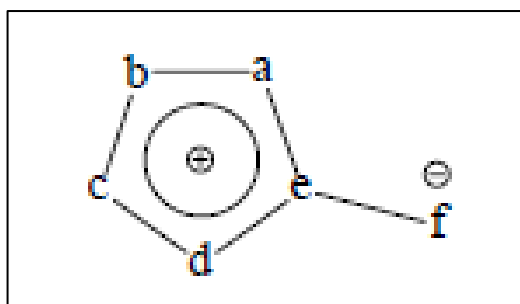
ativo é a miltefosina) para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Sendo o tratamento de única responsabilidade do proprietário, não tendo auxílio financeiro do governo e devendo ser realizado junto a medidas preventivas (MAPA, 2016).

Uma das medidas preventivas disponível é a utilização de repelentes com princípios ativos de piretroides (flumetrina, deltametrina e permetrina), que podem ser utilizados de forma tópica ou como coleiras. Ambas as formulações apresentam eficácia semelhante, mas o tempo de duração varia entre 2 semanas a 1 mês, para aplicação tópica, e 4 a 8 meses para as coleiras. Segundo Werneck (2016, apud OPAS, 2019<sup>a</sup>), a utilização de coleiras, com 4% de deltametrina, por metade da população canina reduz em 50% a prevalência de leishmaniose canina na região (KASZAK, PLANELLAS, DWORECKA-KASZAK, 2015; DANTAS-TORRES et al, 2018; RIBEIRO et al., 2018; OPAS, 2019<sup>a</sup>).

Outro método preventivo disponível é a vacinação, tendo duas formulações disponíveis no mercado, a Canilesh<sup>®</sup> e a Leish-Tec<sup>®</sup>. A Canilesh<sup>®</sup> é uma vacina produzida a partir do sobrenadante da cultura de promastigotas de *L. infantum*, contendo a proteína 54 KDa desse parasito integrado ao dipeptídeo muramil. É autorizada para uso na Europa, Paraguai e Argentina, possuindo eficácia de 68,4%. A Leish-Tec<sup>®</sup> é uma vacina recombinante da proteína A2 presente em formas amastigotas associada ao adjuvante saponina, com eficácia de 71%, sendo comercializada somente no Brasil. Ambas as formulações possuem efeitos temporários necessitando de doses de reforço anualmente (RIBEIRO et al., 2018; DANTAS-TORRES et al, 2018; MARCONDES, DAY, 2019).

## 2.5. Sais Mesoioônicos

Os sais mesoioônicos são uma classe de compostos químicos caracterizados por apresentarem estrutura heterocíclica plana formada por cinco ou seis membros com carga parcial positiva contrabalanceada por uma carga parcial negativa gerada por um átomo  $\alpha$  exocíclico localizado no mesmo plano do anel (**Figura 18**) (LIRA, 2004; RODRIGUES et al, 2007; SOARES-BEZERRA et al, 2008).

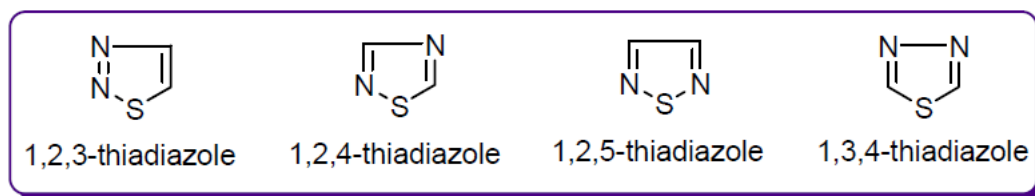


**Figura 18:** Estrutura heterocíclica do sal mesoioônico apresentando um anel com carga interna positiva contrabalanceado por um átomo exocíclico (f) de carga negativa. Fonte: LIRA, 2004.

O anel heterocíclico é formado por uma combinação dos elementos: carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e enxofre (S), aferindo ser possível produzir 198 compostos mesoioônicos. Esses compostos diferem conforme a sua tautomeria, podendo ser divididos em tipo A e B. No tipo A, o arranjo mais estável é a conformação fechada, enquanto no grupo B as estruturas acíclicas são mais estáveis (LIRA, 2004).

Nos mesoioônicos do tipo A encontram-se os compostos com anéis formados pela combinação de dois átomos de C, dois átomos de N e um átomo de S, chamados de

tiadiazólio. Esse sal mesoiônico ocorre em quadro isoformas, de acordo com a localização dos átomos de N, conforme relacionado na **Figura 19**. Todas as moléculas derivadas do tiadizólio são sintéticas com exceção do dendrodoine e do policarpatiamina A e B, que são derivados naturais da isoforma 1,2,4 tiadizólio extraídos de ascídias da família Styelidae (espécies *Dendrodoa grossularia* e *Polycarpa aurata*, respectivamente) (SERBAN, 2019).



**Figura 19:** Isômeros do anel tiadiazólio. Fonte: SERBAN, 2019.

A conformação físico-química dos tiadiazólios assegura uma alta atividade biológica devido a sua atuação como: domínio para pontes de hidrogênio; doadores de elétrons e bioisósterol de pirimidina, tiazol, oxazol, oxadiazol, benzeno e piridazina. Além disso, o elevado momento dipolo, da ordem de 5D, a neutralidade de carga, gerada pelo deslocamento das cargas em polo positivo e negativo, e a conformação planar da molécula, facilitam a interação com biomoléculas e a alta permeabilidade da membrana plasmática. Por essa razão, todas as isoformas de tiadiazólio, são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica como componentes de diversos medicamentos como: timolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico), acetazolamida e metazolamida (inibidores de anidrase carbônica), utilizados no tratamento de glaucoma; megazol, um anti-tripanososoma; sulfametazina e os medicamentos do grupo cefalosporinas, usados como antibióticos; tizanidina (agonista do receptor  $\alpha$ 2- adrenérgico) utilizado como relaxante muscular; e xanomelina, um agonista dos receptores de acetilcolina subtipo M1 e M4, com efeito anti-dopanérgico e anti-psicótico (LIRA, 2004; RODRIGUES et al, 2007; SERBAN, 2019).

Dentre as isoformas de tiadizólio, a 1,3,4 tiadiazólio é a mais estudada e possui diversas atividades biológicas descritas. A principal delas é o efeito antitumoral produzido pelos compostos conhecidos como MI-D (cloreto de 4- fenil-5(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina), MI-4F (cloreto de 4-fenil-5(4-fluor-cinaoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina) e MI-2,4 diF (cloreto de 4-fenil-5(2,4-difluor-cinaoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina). Todos os compostos apresentam efeito sobre viabilidade de carcinoma murino (Ehrlich), sarcoma murino (S180), melanoma murino (B16-F10) e humano (MEL-85, SK-MEL, A2058 E MEWO) e hepatocarcinoma humano (HEPG2), sendo MI-D o mais ativo. O mecanismo de ação desses compostos ainda não é totalmente compreendido, mas acredita-se que sua atividade antitumoral esteja relacionada à ação desacopladora sobre a mitocôndria causando a inibição da cadeia respiratória, da ATPase e da peroxidação lipídica. Exclusivamente, MI-D atua colapsando o potencial de membrana devido à redução da fluidez e elasticidade da membrana mitocondrial; enquanto MI-4F e MI-2,4 diF agem como agentes antioxidantes reduzindo a oxidação do nucleotídeo piridina (GRYNBERG, SANTOS, ECHEVARRIA, 1997; CADENA et al, 1998, CADENA et al, 2002; SENFF-RIBEIRO et al, 2003; SENFF-RIBEIRO et al, 2004<sup>a</sup>; SENFF-RIBEIRO et al, 2004<sup>b</sup>; MENDEZ-SANCHEZ et al, 2009; PIRES et al, 2010; PIRES et al, 2011; GOZZI et al, 2015; PIRES et al, 2016; SERBAN, 2019).

Além da atividade antitumoral, derivados de 1,3,4 tiadiazólio apresentam efeito analgésico, anti-inflamatório e antitérmico, produzidos por MI-D; efeito antiespasmódico gerado pelos compostos: iodeto de 2-(4-clorofenil)3-fenil-1,3,4-tiadiazólio-5metiltio e 2,3-

difenil-1,3,4-tiadiazólio-5 tioacetato; efeito antibacteriano contra bactérias gram-positiva, gram negativa e cepas resistente de *Staphylococcus aureus*; e efeito antiparasitário sobre *Leishmania* e *Trypanosoma* (OLIVEIRA et al, 2011; PIRES et al, 2011; LUIS et al, 2014).

O efeito anti-*Leishmania* é descrito para quatro compostos derivados de 1,3,4-tiadiazólio em diferentes condições. O composto cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= H, OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, CN, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> e OH. Y= OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, Cl e Br) apresenta efeito citotóxico *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, e formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, tendo eficácia variável dependendo da espécie tratada e do substituinte do composto. Além do efeito citotóxico, os substituintes 4- OCH<sub>3</sub> e 3-OCH<sub>3</sub> são descritos por reduzirem a produção de NO de ambas as formas de *L. amazonensis*, pois afetam a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Já *in vivo* o composto reduz a carga parasitária da infecção por *L. amazonensis*, e somente o substituinte 3-OCH<sub>3</sub> aumenta a produção de óxido nítrico (NO) pelos nódulos linfáticos (DA SILVA et al, 2002; RODRIGUES et al, 2007; SOARES-BEZERRA et al, 2008; RODRIGUES et al, 2009).

O composto cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-fenil)- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>,. Y= OCH<sub>3</sub>) apresenta efeito *in vitro* sobre ambas as formas de *L. amazonensis* e possui capacidade de inibir a atividade da NOS de *Leishmania*. Além disso, o substituinte 4-NO<sub>2</sub> inibe a atividade da tripanotiona redutase de extratos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *Trypanosoma cruzi*. O efeito *in vivo* é descrito em infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum*, e o composto é capaz de reduzir a carga parasitária, sendo o substituinte 4-NO<sub>2</sub> o mais ativo (RODRIGUES et al, 2011; RODRIGUES et al, 2012; SOARES-BEZERRA et al, 2013).

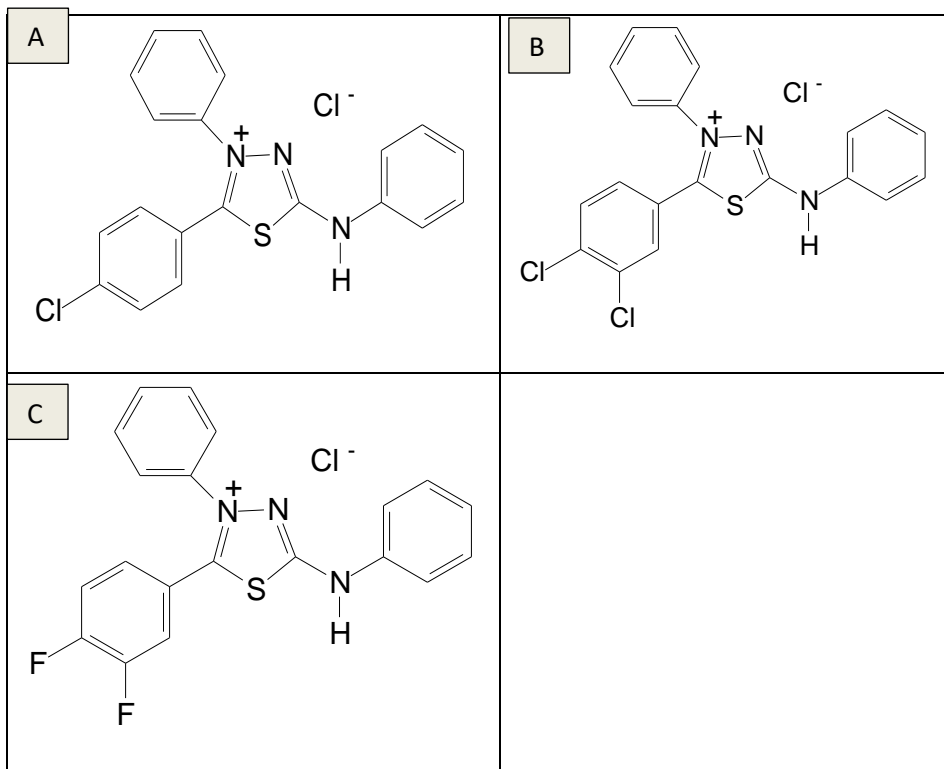
Os compostos X-1-[5-(1-metil-5-nitro-1H-imidazol-2-il)-1,3,4-tiadiazólio-2-il]-4-“aroyl” piperazina (X= fenil; 2-Cl-fenil; 3- Cl-fenil; 4-Cl-fenil; tiofeno-2-il; 5-Cl-tiofeno-2-il; 5-Br-tiofeno-2-il) e uma série de derivados de nitroheteroaril - 1,3,4-tiadiazólio possuem seu efeito descrito sobre formas promastigotas de *L. major in vitro*, apresentando eficácia variável dependendo do substituinte. A série de derivados de nitroheteroaril - 1,3,4-tiadiazólio também apresenta efeito *in vitro*, para formas amastigotas, e *in vivo* de *L. major*. (BEHROUZI-FARDMOGHADAM et al, 2008; POORRAJAB et al, 2009; POORRAJAB, FOROUZANNIA, TABATABAEE, 2012)

Nesse trabalho, nós iremos avaliar o efeito de uma nova série de substituintes do composto cloreto de 4 fenil-5-(X - fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina nunca antes testada. Os novos substituintes são: MI- 4 Cl (cloreto de 4 fenil-5-(4-cloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-A**), MI-3,4 diCl (cloreto de 4 fenil-5-(3,4-dicloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-B**), e MI-3,4 diF (cloreto de 4 fenil-5-(3,4-difluor-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-C**).

Esses novos substituintes apresentam diferentes valores do Coeficiente de partição (Log P) e da constante do substituinte de Hammett ( $\sigma$ ), conforme apresentado no **Quadro 3**. O Log P avalia a lipossolubilidade da molécula, estabelecendo que valores mais elevados possuem uma maior lipofilicidade, ou seja maior facilidade de interagir com lipídeos. Portanto alterações no Log P influenciam na capacidade da molécula em interagir e penetrar em membranas plasmáticas. Já  $\sigma$ , avalia os efeitos eletrônicos da molécula determinando sua polarização e ionização. Alterações nos valores de  $\sigma$  influenciam a interação e ligação com outras moléculas.

Esses novos compostos foram sintetizados pela Dra Áurea Echevarria e foram gentilmente cedidos para realização desse trabalho.





**Figura 20:** Estrutura química dos compostos mesoiônicos cloreto de 4 fenil-5-(X - fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= 4 Cl; 3,4 diCl e 3,4 diF). A= MI- 4 Cl. B= MI-3,4 diCl. C= MI-3,4 diF .

**Quadro 3:** Valores calculados de Log P e  $\sigma$  para MI- 4 Cl. B= MI-3,4 diCl. C= MI-3,4 diF

Substituinte	Log P*	$\sigma$
4-Cl	3,27	+ 0,24
3,4-di Cl	3,88	+ 0,61
3,4-di F	2,85	+ 0,49

\* Calculado pelo programa Molinspiration

### 3 OBJETIVOS

Esse trabalho tem por objetivo analisar os efeitos citotóxicos de três compostos mesoiônicos, MI-4 Cl (4-fenil-5-(4-cloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina), MI-3,4 diCl (4-fenil-5-(3,4-dicloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) e MI-3,4 diF (4-fenil-5-(3,4-difluor-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) sobre a *Leishmania amazonensis in vitro*.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito de MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF em formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro*;
- b) Avaliar a citotoxicidade de MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF em macrófagos murinos;
- c) Avaliar o efeito de MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF em formas amastigotas intracelulares em macrófagos infectados *in vitro*;
- d) Quantificar a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com os compostos mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF;
- e) Analisar o perfil lipídico de formas promastigotas tratadas com os compostos mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF;
- f) Analisar o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas tratadas com os compostos mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1. Sais Meso-iônicos

Os compostos meso-iônicos MI-4 Cl (4-fenil-5-(4-cloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina), MI-3,4 diCl (4-fenil-5-(3,4-dicloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) e MI-3,4 diF (4-fenil-5-(3,4-difluor-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) foram gentilmente fornecidos pela Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RJ), Brasil. Os sais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, alíquotados na concentração de 125 mM e armazenados a 4°C.

### 4.2. Parasitos

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) foram cultivadas em “Schneider Insect Medium” pH 6,8 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado e 50 µg/ml de gentamicina, à 26 °C.

### 4.3. Animais

Camundongos BALB/c foram obtidos da Universidade Federal Fluminense (UFF) e mantidos para experimentação no Laboratório de Imunologia e Virologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os animais foram mantidos em ambiente controlado com 12h de luz, temperatura em torno de 21°C e acesso constante à alimentação e água. A utilização dos animais foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária (CEUA/IV) da UFRRJ, sobre número de protocolo 2606010618.

### 4.4. Células

Macrófagos murinos de linhagem RAW 264,7 foram cultivadas em meio “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM), suplementado com 10% de SFB inativado e 50 µg/ml de gentamicina, à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.5. Obtenção de Macrófagos Murinos Peritoneais

Camundongos BALB/c com idades entre 8 e 12 semanas foram inoculados peritonealmente com 1,5 ml de tioglicolato 3%. Após três dias, macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal com meio RPMI 1640 a 4 °C e livre de SFB. As células foram centrifugadas, a 1500 rpm ( $xg=458$ ) por 10 minutos a 10 °C, contadas em câmara de Neubauer para determinar concentração conforme cada experimento e incubadas “overnight” em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB inativado e 50 µg/ml de gentamicina, à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.6. Efeito Anti - Promastigotas

O efeito anti-promastigota dos compostos sobre a espécie *L. amazonensis* foi analisado através de dois ensaios. Um ensaio de cinética de interação saís-parasito para avaliar o efeito da droga em diferentes concentrações no decorrer do tempo. E um ensaio de XTT para avaliar o efeito dos saís mesoiônicos sobre as enzimas desidrogenases mitocondriais do parasito.

#### **4.6.1. Cinética**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml foram plaqueadas em placas de 24-poços e incubadas por 72 horas à 26 °C com os saís mesoiônicos em diferentes concentrações (12.5, 25, 50, 75 e 100 µM). Como controles foram utilizados parasitos incubados somente com meio Scheneider ou com meio Schneider mais DMSO 0,1%. Formas promastigotas viáveis foram contadas em Câmara de Neubauer a cada 24 horas.

#### **4.6.2. Ensaio de XTT**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml foram plaqueadas em placas de 96-poços e incubadas por 48 horas à 26 °C com os saís mesoiônicos na concentração de 50 µM. Como controles foram utilizados parasitos incubados somente com meio Scheneider ou com meio Schneider mais DMSO 0,04%. Após as 48 horas, 50 µL de solução de XTT, nas concentrações de 1 mg/ml XTT (XTT (2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt) e 200 mM PMS ((Phenazine Methosulfate), foi adicionado a placa e parasitos foram incubados por 2 horas à 35°C com 5% CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação a absorvância do produto da reação foi lido utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm (Microplate reader MOD. 3550-UV)

### **4.7. Efeito Citotóxico sobre Macrófagos Peritoneais**

O efeito citotóxico sobre macrófagos murinos foi analisado através de dois ensaios. Um ensaio de XTT para avaliar o efeito dos saís meosiônicos sobre as enzimas desidrogenases mitocondriais dos macrófagos. E através do ensaio de coloração com azul de trypan para avaliar danos na membrana celular.

#### **4.7.1. Ensaio de XTT**

Macrófagos murinos obtidos de camundongos BALB/c através de lavado peritoneal (conforme descrito no item 4.5) na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço foram cultivados em placas de 96-poços em interação com os saís mesoiônicos nas concentrações de 50, 100 e 200 µM, por 48 horas à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente às 48 horas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do XTT.

#### **4.7.2. Coloração com “Trypan Blue”**

Macrófagos murinos obtidos de camundongos BALB/c através de lavado peritoneal (conforme descrito no item 4.5) na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço foram cultivados em placas de 24-poços em interação com os saís mesoiônicos nas concentrações de 50, 75, 100 e 200 µM, por 48 horas à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente às 48 horas, células foram lavadas com PBS 1X a 37 °C, coradas com azul de trypan 0,03% e contadas em microscópio invertido.

#### **4.8. Efeito Anti- Amastigotas**

Macrófagos murinos de linhagem (RAW 264,7) foram plaqueados, na concentração  $2 \times 10^5$  células por poço, em placa de 24 poços durante duas horas à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1X, infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis*, na razão de 10 parasitos para 1 macrófago, e incubadas “overnight” nas condições anteriores. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x para retirar parasitos não internalizados, e tratadas com os sais mesoiônicos nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 75 µM, por 24 horas. Ao término do tratamento, as células foram lisadas, com 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para liberar formas amastigotas. Após a lise formas amastigotas foram incubadas com meio “Schneider Insect Medium” pH 6,8 suplementado com 10% SFB por 48 horas à 26°C até diferenciação completa em formas promastigotas. Posteriormente uma alíquota de 100 µL de cada poço, contendo formas promastigotas, foi transferida para uma placa de 96 poços e adicionado 10 µL de resazurina (0,125 mg/ml). Em seguida a placa foi incubada à 35 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas e a fluorescência do produto da reação foi lido utilizando o espectrofotômetro nos comprimento de onda de 540 nm (excitação) e 610 nm (emissão).

#### **4.9. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)**

Macrófagos murinos obtidos de camundongos BALB/c através de lavado peritoneal (conforme descrito no item 4.5) na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço foram plaqueados em placas de 96-poços, tratados ou não com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 100ng/ml por 2 horas e em seguida foi adicionado os sais mesoiônicos nas concentrações de 25 e 50 µM, por 48 horas a 35 °C com 5% CO<sub>2</sub>. Após as 48 horas de incubação, o sobrenadante foi recolhido e a análise da dosagem do nitrito foi realizada pelo método de Griess.

#### **4.10. Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $5 \times 10^6$  parasitos/ml foram plaqueadas em placas de 24-poços e incubadas por 48 horas a 26 °C com os sais mesoiônicos na concentração do IC<sub>50</sub>/48 h. Após esse período, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS 1x, contados e o número de células foi igualado pelo menor número de parasitos encontrados nos grupos tratados. O reagente JC1 na concentração de 5mg/ml foi adicionado e os parasitos foram incubados a 35 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Posteriormente, os parasitos foram lavados com PBS 1x e a fluorescência da reação foi lida utilizando o espectrofotômetro nos comprimento de onda de 525 nm (excitação) e 590 nm (emissão) / 490 nm (excitação) e 530 nm (emissão).

#### **4.11. Efeito sobre Perfil Lipídico**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml foram cultivadas por 48 horas a 26 °C com os sais mesoiônicos na concentração do seus IC<sub>50</sub>/48 h. Após esse período, parasitos foram lavados três vezes com PBS 1X, contados e número de células foi igualado a  $3 \times 10^6$  parasitos/ml. As amostras foram utilizadas para extração de lipídios.

#### **4.11.1. Extração lipídica**

A extração lipídica foi realizada de acordo com Bligh e Dyer (1959). As amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X, em seguida foi adicionado uma mistura de metanol: clorofórmio: água (2:1:0,8 v/v). Amostras foram submetidas à agitação intermitentemente durante 1 hora, seguido de centrifugação a 3000 rpm por 20 min. O sobrenadante contendo os lipídios extraídos foi recolhido e o precipitado foi submetido a uma nova extração. Ao final, ambos os sobrenadantes recolhidos foram incubados com uma solução de clorofórmio-água (1:1 v/v). Os sobrenadantes foram centrifugados por 3000 rpm por 30 min para separação das fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi separada e armazenada em tubos de microcentrífuga.

#### **4.11.2. Gravimetria**

Para definir a quantidade de lipídios, a fase orgânica foi seca utilizando arraste de nitrogênio (N<sub>2</sub>) em banho seco a 37 °C até completa evaporação dos solventes. Após secagem, os tubos foram pesados e a quantidade de lipídios foi estabelecida pela diferença entre pesos dos microtubos vazios e peso dos microtubos com amostra já seca. Após a gravimetria, as amostras foram resuspensas em 20 µl de clorofórmio, homogenizadas e utilizadas para análise do perfil lipídico.

#### **4.11.3. Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)**

O perfil lipídico foi determinado por cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC). Para isso amostras foram aplicadas em placas de gel de sílica 60, e submergidas numa solução de n-hexano-éter dietílico-ácido acético (30:40:0,5 V/V) para separação dos lipídios neutros. Para revelação das bandas formadas, placas foram coradas com reagente cromogênico de Charring e aquecidas a 200 °C por 30 minutos. Após revelação placas foram escaneadas e análise densitométrica foi realizada utilizando o programa Image Master Total Lab. Os lipídios foram identificados por comparação aos padrões monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG), colesterol (CHO), ácido graxo (FA) e colesterol esterificado (CHOE).

#### **4.12. Análise Estatística**

Todos os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 6.0 software. A normalidade dos dados foi analisada através do teste estatístico Dàgostino-pearson omnibus normality test. Para análise das diferenças entre: uma variável com duas categorias foi utilizado o *Student's t-test*; uma variável com três ou mais categorias foi usado o teste one-way ANOVA e para diferenças entre duas variáveis o teste two-way ANOVA. Consideramos como diferença estatística significativa  $p < 0.05$ .

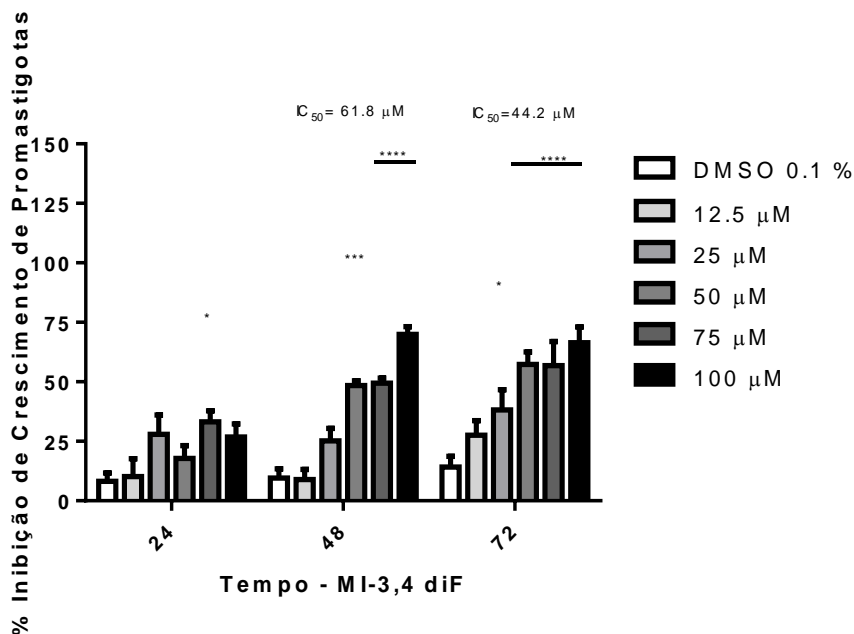
## 5 RESULTADOS

### 5.1. Efeito Anti-Promastigotas

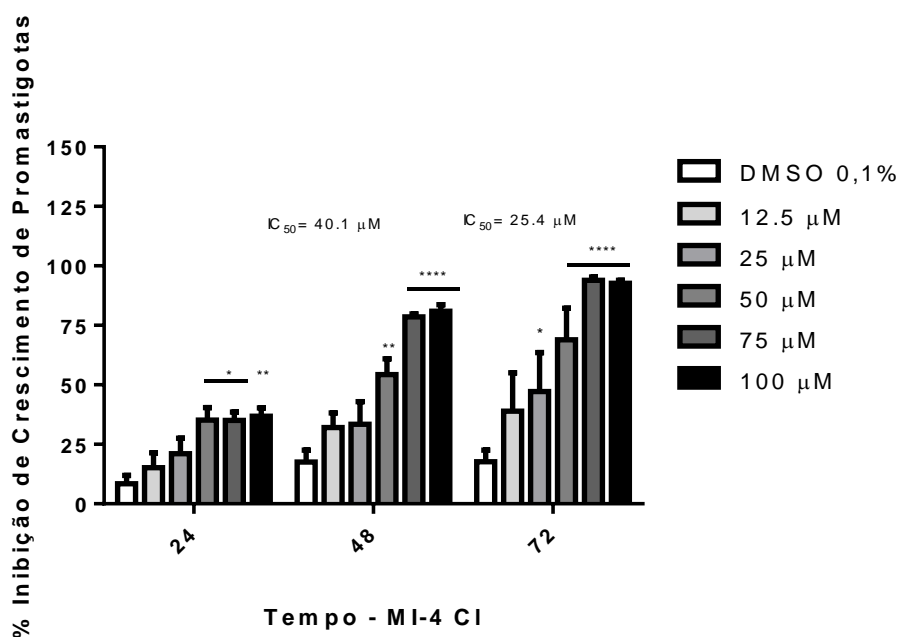
Primeiramente, avaliamos o efeito anti-promastigota dos compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF sobre a espécie *L. amazonensis* através do ensaio de cinética. Nossos dados demonstram que todos os compostos apresentam efeito concentração e tempo dependentes. O composto MI-3,4 diF nas concentrações a partir de 50  $\mu\text{M}$  inibe cerca de 50% (50 e 75  $\mu\text{M}$ ) e 70% (100  $\mu\text{M}$ ) do crescimento das formas promastigotas após 48 horas de tratamento, e esse efeito se mantém por até 72 horas (**Figura 21**). A concentração de 25  $\mu\text{M}$  inibe cerca de 40% do crescimento do parasito somente 72 horas após o início do tratamento. O composto MI-3,4 diF apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 61,8 e 44,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para 48 e 72 horas.

O composto MI-4 Cl inibiu o crescimento das formas promastigotas a partir de 24 horas nas concentrações de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ . Em 48 horas, MI-4 Cl inibe cerca de 55, 79 e 81% do crescimento do parasito, e em 72 horas, inibe cerca de 70% (50  $\mu\text{M}$ ) e 93% (75 e 100  $\mu\text{M}$ ) do crescimento (**Figura 22**). No tempo de 72 horas também é possível observar o efeito da concentração de 25  $\mu\text{M}$ , que inibe 47% do crescimento do parasita. O composto MI-4 Cl apresenta um  $\text{IC}_{50}$  de 40,1 e 25,4  $\mu\text{M}$  para 48 e 72 horas de tratamento, respectivamente.

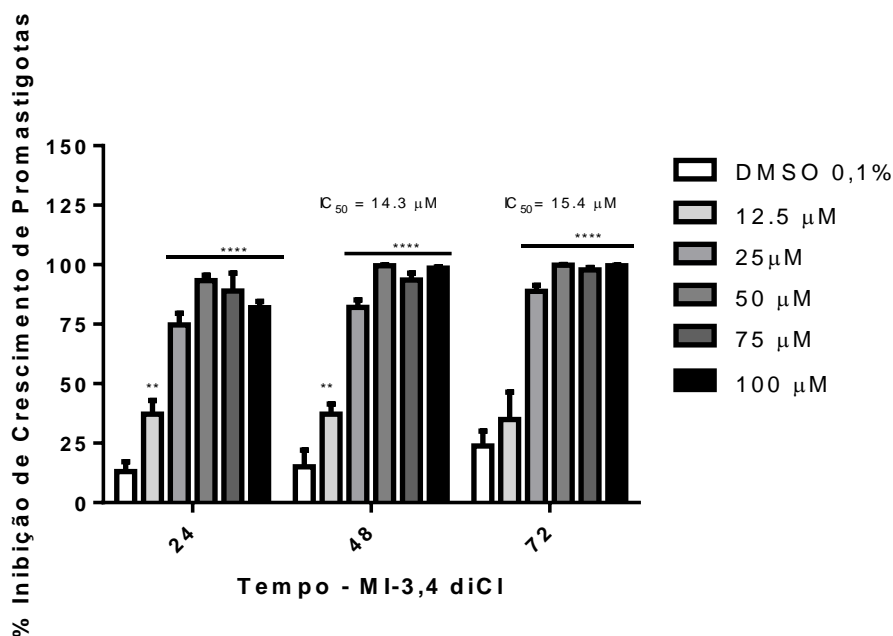
O composto MI-3,4 diCl apresentou o melhor efeito contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo efetivo em todas as concentrações testadas a partir de 24 horas (**Figura 23**). No tempo de 48 horas, a partir de 25  $\mu\text{M}$ , inibiu mais que 80% do crescimento do parasita. Esse composto apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 14,3 e 15,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para 48 e 72 horas de tratamento.



**Figura 21:** Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas foram incubadas com o sal mesoiônico MI-3,4 diF em diferentes concentrações. O número de promastigotas viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer 72 horas após o tratamento. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitos viáveis em relação ao controle não tratado. Teste two-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. \* representa comparação com DMSO 1%.



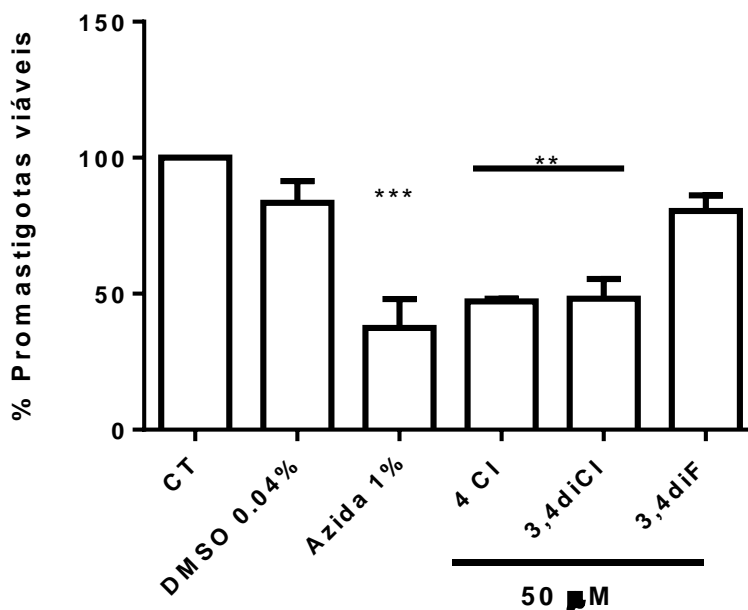
**Figura 22** Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas foram incubadas com o sal mesoiônico MI-4 Cl em diferentes concentrações. O número de promastigotas viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer 72 horas após o tratamento. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste two-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. \* representa comparação com DMSO 1%.



**Figura 23:** Avaliação do efeito anti-promastigota sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas foram incubadas com o sal mesoiônico MI-3,4 diCl em diferentes concentrações. O número de promastigotas viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer 72 horas após o tratamento. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste two-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. \* representa comparação com DMSO 1%.



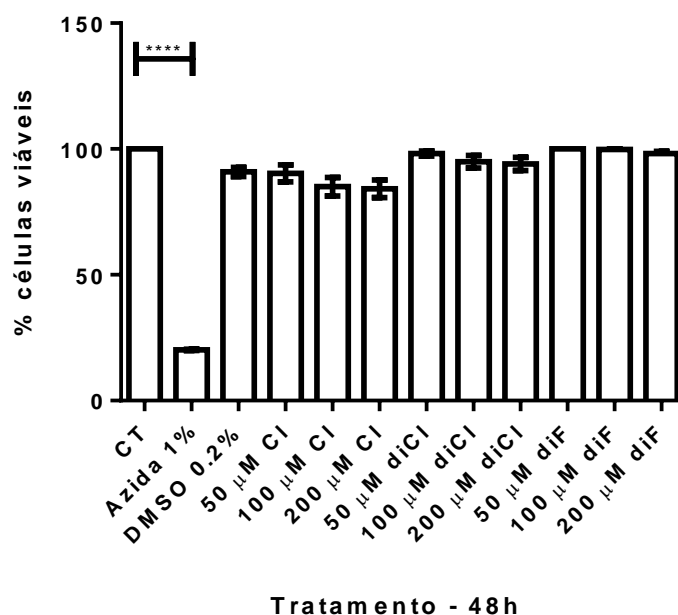
Em seguida, realizamos o ensaio de XTT em promastigotas com o intuito de vermos se os compostos afetam as enzimas desidrogenases mitocondriais. Nossos resultados demonstram que somente os compostos clorados apresentam efeito sobre a atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Ambos os compostos, MI-4 Cl e MI-3,4 diCl na concentração de 50  $\mu$ M inibem cerca de 50% da atividade dessas enzimas (**Figura 24**).



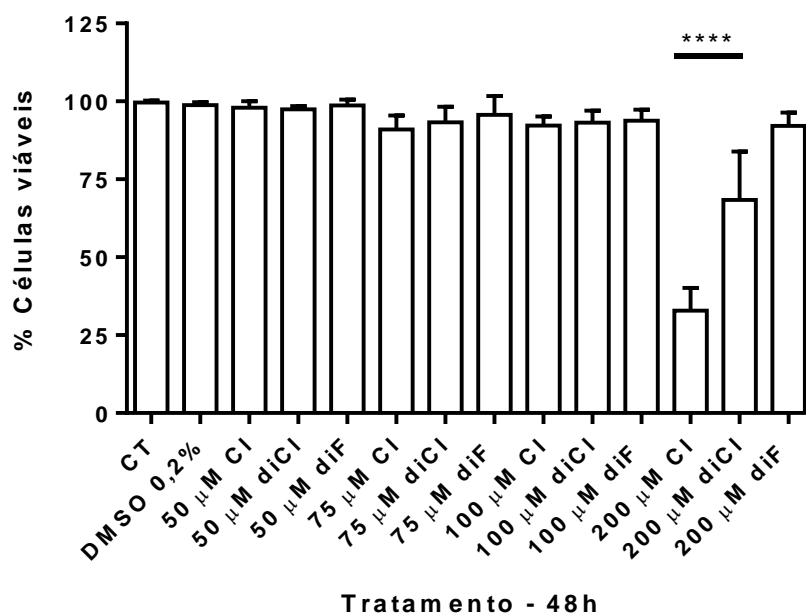
**Figura 24:** Avaliação do efeito citotóxico sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* por XTT. Formas promastigotas foram incubadas com os sais mesoiônicos (MI-4 Cl, MI-3,4 diF, MI-3,4 diCl) na concentração de 50  $\mu$ M por 48 horas. Após esse período a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do XTT. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste one-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. \* representa comparação com DMSO 1%.

## 5.2. Efeito Citotóxico sobre Macrófagos Peritoneais

Em seguida, avaliamos o efeito citotóxico dos compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF na célula hospedeira, através do ensaio de XTT e da coloração com azul de trypan. Os dados do ensaio de XTT demonstraram que nenhum dos compostos apresentou toxicidade aos macrófagos em concentrações até 200  $\mu$ M (**Figura 25**). Entretanto, os compostos MI-4 Cl e MI-3,4 diCl, na concentração de 200  $\mu$ M, provocaram alterações na permeabilidade da membrana plasmática de cerca de 70% e 30 % das células, respectivamente (**Figura 26**).



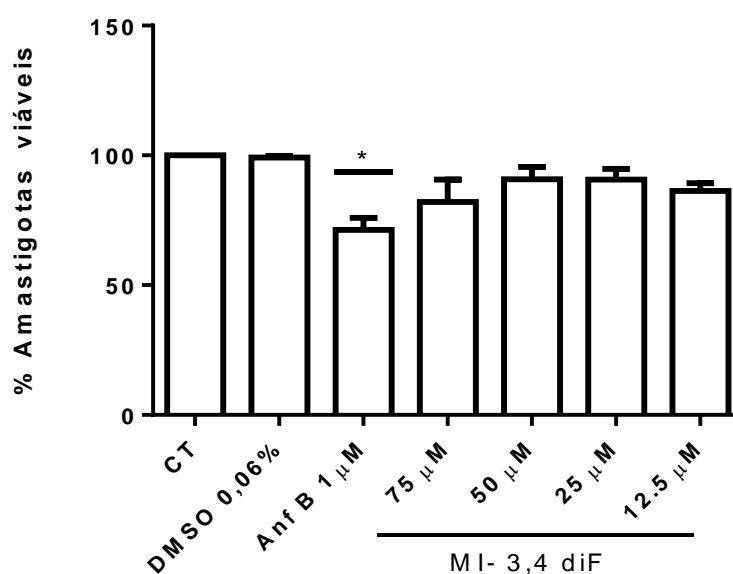
**Figura 25:** Avaliação do efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais. Macrófago murinos de camundongos Balb/c previamente estimulados com tioglicolato 3% foram incubados com sais mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diF e MI-3,4 diCl, nas concentrações de 50, 100 e 200 µM por 48 horas à 34°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do XTT. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de ± SEM e foi expresso como porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado. Teste one-way ANOVA foi utilizado e p<0.05 foi considerado significativo.



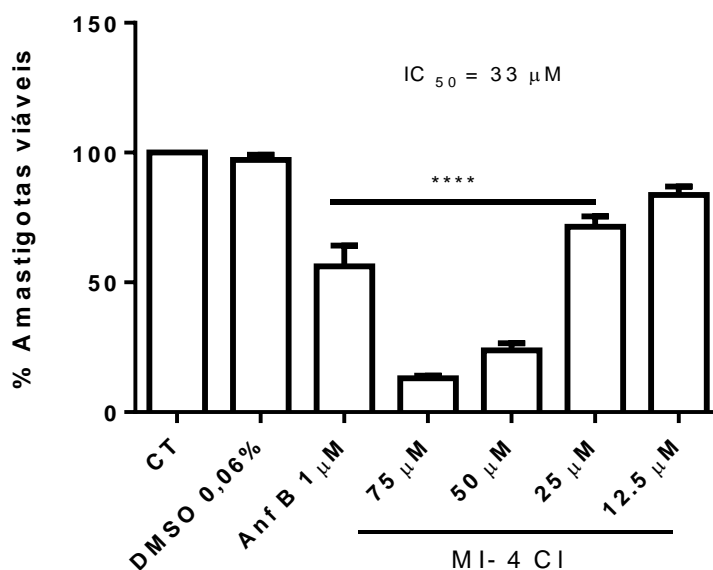
**Figura 26:** Avaliação do efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais. Macrófago murinos de camundongos Balb/c previamente estimulados com tioglicolato 3% foram incubados com sais mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diF e MI-3,4 diCl, nas concentrações de 50, 75, 100 e 200 µM por 48 horas à 34°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente a viabilidade celular foi determinada por coloração com “Trypan Blue” 0,03%. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de ± SEM e foi expresso como porcentagem de células viáveis. Teste one-way ANOVA foi utilizado e p<0.05 foi considerado significativo. \* representa comparação com DMSO 0,2%

### 5.3. Efeito Citotóxico sobre Formas Amastigotas

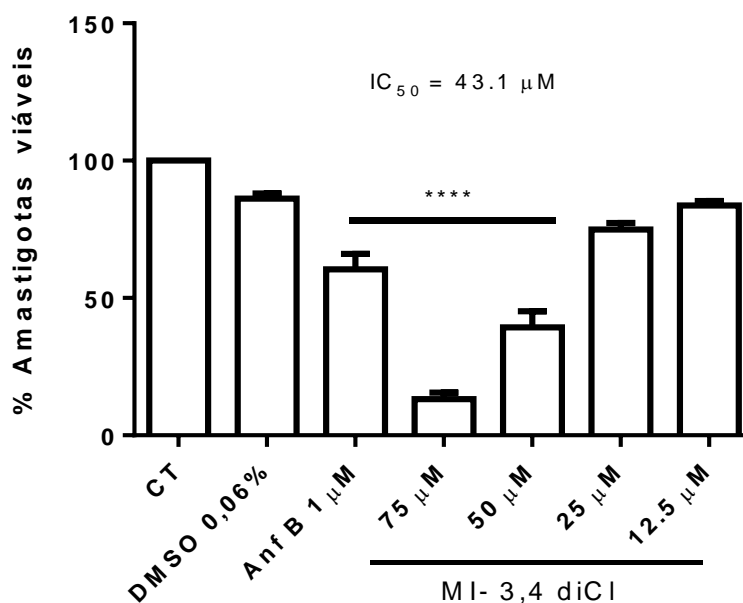
Com intuito de avaliar o efeito anti-amastigota, forma responsável pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero, células RAW 267 foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* e tratadas com diferentes concentrações dos compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF. Os resultados demonstram que o composto MI-3,4 diF não apresenta efeito sobre formas amastigotas em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 27**). Em contrapartida, o composto MI-4 Cl demonstrou maior eficácia, apresentando efeito concentração-dependente, em três das quatro concentrações testadas (75, 50 e 25  $\mu$ M), sendo capaz de reduzir cerca de 86%, 76% e 28% da viabilidade das formas amastigotas, respectivamente (**Figura 28**). Já o composto MI-3,4 diCl só apresentou efeito nas duas maiores concentrações testadas, sendo o efeito de 75  $\mu$ M semelhante ao visualizado para MI-4Cl (inibindo cerca de 86% da viabilidade), enquanto o efeito de 50  $\mu$ M foi um pouco mais discreto, reduzindo somente cerca de 60% da viabilidade do parasita (**Figura 29**).



**Figura 27:** Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. Células RAW 264,7 infectadas com *Leishmania amazonensis* na razão de 10p:1m foram tratadas com sal mesoiônico MI-3,4 diF em diferentes concentrações por 24 horas. Posteriormente, as células foram lisadas com SDS 0,5% e formas amastigotas liberadas foram quantificadas por resazurina. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste one-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. CT= controle não tratado e Anf B = anfotericina B. \* representa comparação com DMSO 0,06%.



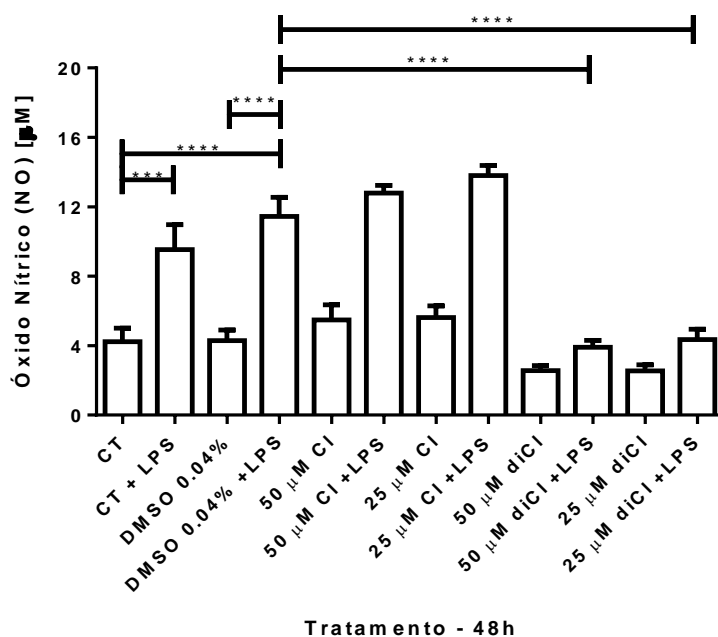
**Figura 28:** Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. Células RAW 264,7 infectadas com *Leishmania amazonensis* na razão de 10p:1m foram tratadas com sal mesoiônico MI-4 Cl em diferentes concentrações por 24 horas. Posteriormente, as células foram lisadas com SDS 0,5% e formas amastigotas liberadas foram quantificadas por resazurina. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste One-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. CT= controle não tratado e Anf B = anfotericina B. \* representa comparação com DMSO 0,06%.



**Figura 29:** Avaliação do efeito citotóxico sobre formas amastigotas. Células RAW 264,7 infectadas com *Leishmania amazonensis* na razão de 10p:1m foram tratadas com sal mesoiônico MI-3,4 diCl em diferentes concentrações por 24 horas. Posteriormente, as células foram lisadas com SDS 0,5% e formas amastigotas liberadas foram quantificadas por resazurina. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM e foi expresso como porcentagem de parasitas viáveis em relação ao controle não tratado. Teste One-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. CT= controle não tratado e Anf B = anfotericina B. \* representa comparação com DMSO 0,06%.

## 5.4. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Visto que o óxido nítrico possui um importante efeito tóxico sobre microrganismos intracelulares, decidimos avaliar se duas concentrações (50 e 25  $\mu\text{M}$ ) dos compostos MI-4 Cl e MI-3,4 diCl modulam a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados com LPS (100 ng/ml) ou em repouso. Os dados demonstram que nos macrófagos ativados com LPS houve um aumento de 2,5 vezes na produção de NO quando comparados com macrófagos controle não ativados. Os macrófagos não ativados e tratados com os sais mesoiônicos não apresentaram alteração na produção de NO quando comparados com macrófagos controle apenas na presença de DMSO 0,04%. Somente os macrófagos ativados e tratados com o composto MI-3,4 diCl, em ambas as concentrações, apresentam uma redução de 2,9 vezes (50  $\mu\text{M}$ ) e 2,6 vezes (25  $\mu\text{M}$ ) na produção de NO quando comparados com macrófagos tratados com DMSO 0,04% e ativados com LPS. (**Figura 30**). Esses resultados demonstram que o composto MI-4 Cl não modula a produção de NO em macrófagos e indica um efeito anti-oxidante do composto MI-3,4 diCl.

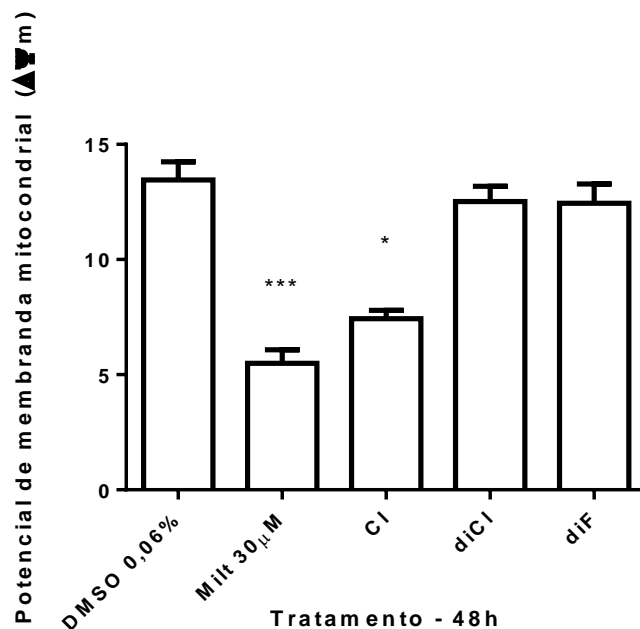


**Figura 30:** Dosagem de Óxido Nítrico (NO). Macrófagos foram ativados ou não com LPS (100ng/ml) na presença ou não dos sais mesoiônicos (MI-4 Cl e MI-3,4 diCl) nas concentrações, 50 e 25  $\mu\text{M}$ , por 48h. Após esse período a dosagem do NO foi determinada pelo método de Griess. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM. Teste one-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5.5. Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

Em virtude dos compostos clorados apresentarem 50% de redução da viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* quando analisados pelo ensaio de XTT, que mede a viabilidade celular a partir de dano mitocondrial, decidimos analisar o potencial de membrana mitocondrial. Para isso, formas promastigotas foram tratadas com os sais mesoiônicos na concentração do  $\text{IC}_{50}$  por 48 horas e posteriormente incubadas com JC1. JC1 é um reagente que se liga a membrana mitocondrial energizada, formando monômeros que emitem

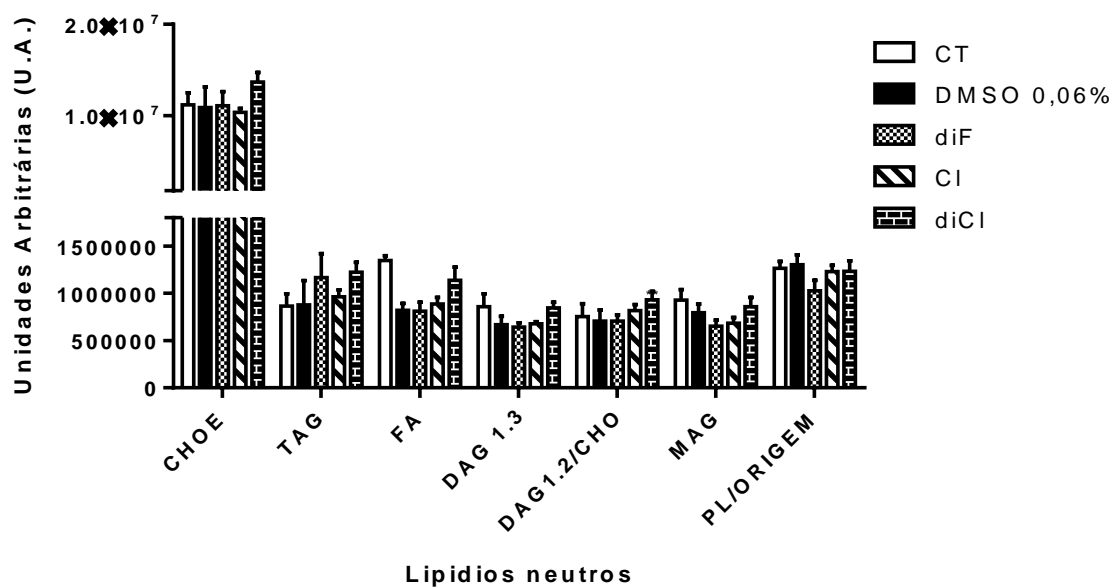
fluorescência verde, quando o potencial de membrana é baixo, ou agregados que emitem fluorescência vermelha, quando o potencial de membrana é alto. Nossos dados demonstram que somente o composto MI-4 Cl foi capaz de alterar o potencial de membrana mitocondrial, reduzindo-o em 50% (**Figura 31**).



**Figura 31:** Efeito sobre o Potencial de Membrana Mitocôndrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratados com os sais mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF na concentração do  $IC_{50}$  por 48h. Após esse período potencial de membrana mitocondrial foi mensurado por ensaio de JC-1. Os resultados representam dados de três experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM. Teste One-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo. Milt = miltefosina. \* em relação ao DMSO 0,06% .

## 5.6. Efeito sobre Perfil Lipídico

Com o objetivo de avaliar se os compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF poderiam induzir alterações no perfil lipídico, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas por 48 horas com a concentração do  $IC_{50}$  desses sais. Posteriormente, o perfil lipídico foi definido através de HPTLC. Nossos dados demonstram que nenhum dos compostos altera o perfil dos lipídios neutros. Entretanto, apesar de não haver diferença estatística, o composto MI-3,4 diCl apresenta tendência a aumentar as quantidades de colesterol (CHO), colesterol esterificado (CHOE), ácido graxo (FA), diacilglicerol (DAG) (**Figura 32**).



**Figura 32:** Perfil Lipídico de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas foram tratadas por 48 horas com os sais mesoiônicos MI-4 CI, MI-3,4 diCI e MI-3,4 diF nas concentrações do IC<sub>50</sub>. Posteriormente, o perfil lipídico foi mensurado por HPTLC. Os resultados representam dados de dois experimentos independentes realizados em triplicata com média de  $\pm$  SEM. Teste One-way ANOVA foi utilizado e  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

## 6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são um sério problema de saúde pública afetando milhões de pessoas anualmente em diversos países. Atualmente são consideradas pela OMS como uma das sete doenças tropicais mais importante no mundo (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Entretanto, também é considerada uma doença negligenciada, pois afeta principalmente a população de países pobres, não havendo interesse pelas industriais farmacêuticas. Por tal razão, a terapia disponível para tratamento dessas doenças, é realizada com medicamentos extremamente tóxicos, apresentando diversos efeitos colaterais, e elevado custo de produção. Além disso, relato de cepas resistentes tem aumentado nos últimos anos. Por esse motivo, a busca por novas moléculas bioativas, faz-se necessária.

Sais mesoiônicos são uma subclasse do grupo betaína amplamente estudada desde a década de 50, sendo de grande interesse para as áreas industriais, agrícola, farmacêutica e médica devido a sua ampla atividade biológica como analgésico, anti-inflamatório, antiespasmódico, antioxidante, antibacteriano, antitumoral, antifúngico e antiparasitário. Tal efeito é devido ao deslocamento de cargas em polos positivos e negativos da molécula, que estimula um momento dipolo elevado na ordem de 5D (LIRA, 2004, RODRIGUES et al, 2012; SERBAN, 2019).

Nesse trabalho avaliamos o efeito de uma nova série de compostos mesoiônicos derivados de 1,3,4 tiadiazólio conhecidos como: MI- 4 Cl (cloreto de 4 fenil-5-(4-cloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-A**), MI-3,4 diCl (cloreto de 4 fenil-5-(3,4-dicloro-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-B**), e MI-3,4 diF (cloreto de 4 fenil-5-(3,4-difluor-fenil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) (**Figura 20-C**). Esses novos compostos nunca foram testados e nesse trabalho avaliamos seus efeitos sobre ambos os estágios do desenvolvimento da *L. amazonensis in vitro*.

Nossos resultados demonstram que todos os compostos foram ativos contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Entretanto a eficácia foi variável dependendo do substituinte, sendo o composto fluorado (MI-3,4 diF) o que apresentou efeito mais discreto, sendo efetivo somente nas concentrações de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , inibindo cerca de 50% (50 e 75  $\mu\text{M}$ ) e 70% (100  $\mu\text{M}$ ) do crescimento das formas promastigotas. Já o composto mais ativo, MI-3,4 diCl apresentou efeito em quatro das cinco concentrações testadas, apenas não possuindo efeito na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ . Esse composto foi capaz de reduzir mais de 50% da viabilidade de formas promastigotas somente nas primeiras 24 horas de tratamento. O composto MI-4 Cl apresentou um efeito mais discreto que MI-3,4 diCl, sendo capaz de inibir 55, 79 e 81% do crescimento do parasito após 48 horas de tratamento com as concentrações de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Nossos achados corroboram os achados de Da Silva e colaboradores (2002), Rodrigues e colaboradores (2007) e Soares-Bezerra e colaboradores (2013), que observaram o efeito dos sais mesoiônicos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo esse efeito variável conforme o substituinte da molécula. A série de compostos testada por Soares-Bezerra e colaboradores (2013) é a que mais se assemelha estruturalmente aos compostos utilizados nesse trabalho, variando somente nos substituintes. Segundo esse autor, os compostos, cloreto de 4-fenil-5-(4-X-fenil)- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= OCH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub>), avaliados tiveram valores de IC<sub>50</sub> próximos de 13  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de tratamento, coincidindo com os valores encontrados por nós para MI-3,4 diCl (IC<sub>50</sub> = 14,3  $\mu\text{M}$  para 48 horas de tratamento). Entretanto os valores de IC<sub>50</sub> de MI-4 Cl (40,1  $\mu\text{M}$  e 25,4  $\mu\text{M}$ , para 48 e 72 horas respectivamente) e MI-3,4 diF (61,8  $\mu\text{M}$  e 44,2  $\mu\text{M}$  para 48 e 72 horas respectivamente) são mais elevados que os valores encontrados por Da Silva e colaboradores (2002), Rodrigues e colaboradores (2007) e Soares-Bezerra e colaboradores (2013). Esses



autores descrevem 30  $\mu\text{M}$ , como valor mais elevado de  $\text{IC}_{50}$  para o composto cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= CN) após 24 horas de tratamento.

Apesar de MI-4 Cl apresentar um efeito mais discreto que MI-3,4 diCl em formas promastigotas de *L. amazonensis*, essa dinâmica se altera quando avaliamos o efeito anti-amastigota desses sais. O composto MI-4 Cl exibiu melhor efeito sobre formas amastigotas, tendo um  $\text{IC}_{50}$  de 33  $\mu\text{M}$  após 24 horas de tratamento, sendo capaz de inibir cerca de 86%, 76% e 28% da viabilidade das formas amastigotas quando macrófagos infectados foram tratados com as concentrações de 75, 50 e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Em contra partida, o composto MI-3,4 diCl, que foi a droga mais efetiva contra formas promastigotas, apresentou um efeito mais discreto que MI-4 Cl, sendo somente ativo nas concentrações de 75 e 50  $\mu\text{M}$ , tendo  $\text{IC}_{50}$  de 43  $\mu\text{M}$ . Por fim, o composto fluorado não apresentou qualquer efeito sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*.

A falta de efeito sobre formas amastigotas pelo composto MI-3,4 diF é contrário aos achados de Da Silva e colaboradores (2002), que descreve que o composto cloreto de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina como mais ativo contra formas amastigotas axênicas apresentando um  $\text{IC}_{50}/24\text{h}$  de 5,3  $\mu\text{M}$ . Tal divergência pode estar correlacionado ao fato de MI-3,4 diF ser um difluorado e a presença desse segundo flúor altera fatores físico-químicos da molécula, como lipofilicidade ou fatores eletrônicos, reduzindo assim sua atividade biológica. Outra hipótese, seria a presença da região cinamoil nos compostos testados por esse autor, ser mais relevante para a atividade da molécula do que o elemento substituinte.

Além disso, os valores de  $\text{IC}_{50}/24\text{h}$  encontrados por Da Silva e colaboradores (2002) para os demais substituintes, varia de 24  $\mu\text{M}$  para 287  $\mu\text{M}$  sendo metade dos valores apresentados maiores que 100  $\mu\text{M}$ . Baseado nisso, consideramos os compostos MI-4 Cl e MI-3,4 diCl extremamente ativos contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, visto que encontramos valores próximos ao descritos por Da Silva e colaboradores (2002), mas com a diferença que nesse trabalho avaliamos o efeito anti-amastigota sobre macrófagos infectados, o que gera uma dificuldade a mais para a droga entrar em contato direto com o parasita.

Vale ressaltar que MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF não apresentam toxicidade para macrófagos murinos em concentrações até 200  $\mu\text{M}$  quando avaliados pelo ensaio do XTT, que mede a viabilidade celular através de dano mitocondrial. Entretanto os compostos clorados (MI-4 Cl e MI-3,4 diCl) causaram alteração da permeabilidade da membrana dos macrófagos quando tratados com 200  $\mu\text{M}$ . Essa alteração pode estar relacionada ao fato dos compostos clorados apresentarem maior lipofilicidade (valores de log P maiores que 3) do que o composto MI-3,4 diF (log P = 2,85), o que facilita a inserção desses compostos na membranas plasmática (**Quadro 3**). Entretanto o MI-4 Cl apresentou um dano maior a permeabilidade da membrana, do que o composto MI-3,4 diCl demonstrando que possivelmente outros fatores físico-químicos estão relacionados nesse efeito.

Com base nos resultados das atividades biológicas dos compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF decidimos investigar um possível mecanismo de ação desses compostos. Cadena e colaboradores (1998, 2002) e, Pires e colaboradores (2010,2011 e 2016) relatam a ação dos compostos MI-D (cloreto de 4-fenil-5(4-nitrocinaoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina), MI-4F (cloreto de 4-fenil-5(4-fluor-cinamoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina) e MI-2,4 diF (cloreto de 4-fenil-5(2,4-difluor-cinamoíl)-1,3,4-tiadizólio-2-fenilamina) sobre diversos aspectos e funcionalidades da mitocôndria. Fundamentados nisso, decidimos avaliar o potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. amazonensis* quando tratadas com as concentrações de  $\text{IC}_{50}/48\text{h}$  dos sais mesoiônicos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF. Observamos que somente o composto MI-4 Cl foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em 50%. Esse dado corrobora com os achados do grupo de Cadena e

de Pires que relatam a ação desacopladora dos seus compostos, no qual MI-D é o composto mais ativo, abolindo completamente o potencial de membrana na concentração de 65 nmol/mg.

O composto MI-3,4 diCl não foi eficiente para alterar o potencial de membrana, entretanto esse composto inibe 50% da viabilidade de formas promastigotas quando avaliado pelo ensaio de XTT, um reagente colorimétrico que sofre reação quando entra em contato com mitocôndrias ativas. Essas divergências dos resultados podem indicar que esse composto tenha atividade biológica por outro mecanismo de ação. Por tal motivo, decidimos avaliar o efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos.

A produção de NO é um importante mecanismo de eliminação de patógenos intracelulares pelos macrófagos. Para mimetizar tal ação e avaliar a modulação dos sais mesoiônicos sobre essa via, macrófagos ativados por LPS foram tratados com 50 e 25 µM dos compostos que apresentaram atividade anti-amastigota (MI-4 Cl e MI-3,4 diCl). Nossos resultados demonstram que somente MI-3,4 diCl foi capaz de modular os níveis de NO, reduzindo mais que 2x da quantidade de NO liberada pelos macrófagos ativados com LPS. Esses dados se assemelham aos achados de Soares-Bezerra e colaboradores (2008 e 2013), que demonstram um efeito inibidor dos compostos cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina com diferentes substituintes sobre a atividade da NOS extraída de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Contudo, o efeito redutor dos níveis de NO gerado pelo tratamento com MI-3,4 diCl promove um efeito protetor do parasito, não explicando a sua elevada atividade biológica contra o mesmo. Por tal razão decidimos investigar um terceiro mecanismo de ação e avaliar o perfil lipídico das formas promastigotas de *L. amazonensis*, pois é bem estabelecido que o perfil lipídico das células de mamíferos difere dos encontrados em *Leishmania*, sendo assim um excelente alvo terapêutico.

Nesse trabalho, nós avaliamos o perfil de lipídios neutros e observamos que o tratamento com os compostos MI-4 Cl, MI-3,4 diCl e MI-3,4 diF nas concentrações do IC<sub>50</sub>/48h não alteram o perfil lipídico quando comparado ao DMSO 0,06%. Esse dado corrobora os achados por Rodrigues e colaboradores (2007), que não observaram alterações na quantidade de ergosterol de culturas de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* tratadas com cloreto de 4-fenil-5-(4-X ou 3-Y-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (X= H, OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, CN, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> e OH. Y= OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, Cl e Br). Contudo apesar de não haver diferença significativa entre tratados e controles, observamos uma leve tendência de aumento da quantidade de colesterol (CHO), colesterol esterificado (CHOE), ácido graxo (FA) e diacilglicerol (DAG) quando tratados com MI-3,4 diCl.

Em vista dos resultados apresentados nesse trabalho, podemos concluir que os compostos clorados (MI-4 Cl e MI-3,4 diCl) são promissores biomoléculas com atividade anti-*Leishmania* sobre *L. amazonensis*. Contudo, novos experimentos *in vitro* são necessários para elucidar os possíveis mecanismos de ação desses compostos e avaliar se o sinergismo com os medicamentos já utilizados no tratamento da leishmaniose humana e canina melhora a atividade anti-*Leishmania* desses fármacos. Além disso, ensaios *in vivo* são necessários para determinar a toxicidade dos compostos e de possíveis metabólitos secundários; sua biodisponibilidade e sua farmacodinâmica.

## 7 CONCLUSÕES

- Os sais mesoiônicos MI-4Cl, MI-3,4diCl e MI-3,4diF possuem efeito anti-promastigota em *L. amazonensis*, sendo MI-3,4diCl o composto mais eficaz e potente com IC<sub>50</sub> de 14,3 µM;
- Os compostos clorados, MI-4Cl e MI-3,4diCl, apresentam efeito anti-amastigota em *L. amazonensis*. MI-4Cl apresentou a atividade mais eficaz e potente, com IC<sub>50</sub> de 33 µM;
- Nenhum dos três compostos apresenta toxicidade aos macrófagos em concentrações até 200 µM pelo ensaio do XTT;
- Os compostos MI-4Cl e MI-3,4diCl alteram a permeabilidade da membrana de macrófagos na concentração de 200 µM;
- O composto MI-3,4 diCl reduziu em 2x os níveis de NO;
- O composto MI-4Cl reduziu o potencial de membrana mitocondrial em 50%;
- Nenhum dos três compostos alterou o perfil de lipídios neutros de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**AKHOUNDI, M.**, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 2016. doi:10.1371/ journal.pntd.0004349

**ALBERTOS-ALPUCHE, N.** Vectores de la leishmaniasis cutánea en México. *Rev Biomed*, Vol 1, No 2, 1990, p. 92–102.

**ALTOÉ, E.C.F.** Avaliação da relevância da gp63 de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na interação com o hospedeiro invertebrado. 2013. Dissertação de mestrado – Instituto Oswaldo cruz (FIOCRUZ) , Rio de Janeiro, pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016

**ASFARAM, S.**, FAKHAR, M., TESHNIZI, S.H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 2019.

**BEHROUZI-FARDMOGHADAM, M.** et al. Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuranyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]- and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16 4509–4515.

**BLIGH, E.G.**, DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol.* 37:911-913, 1959.

**BRASIL.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006<sup>a</sup>. 120p.

**BRASIL.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006<sup>b</sup>. 136 p.

**BRASIL.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189p.

**BURZA, S.**, CROFT, S.L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The lancet*, vol 392, p. 951-970, 2018.

**CADENA, S.M.S.C.** et al. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *FEBS Letters* 440 (1998) 46<sup>a</sup>50

**CADENA, S.M.S.C.** et al. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. *Cell biochemistry and function*, 2002, 20 31-37

**CHAKRAVARTY, J.**, SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 20, no. 10, p.1251–1265, 2019. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>

**CONITEC.** Relatório de Recomendação: Miltefosina para o Tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Brasília, Ministério da Saúde, 2016. 23p.

**CROFT, S.L., COOMBS, G.H.** Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology*, Vol.19, No.11, 2003.

**CROFT, S.L., SUNDAR, S., FAIRLAMB, A.H.** Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical microbiology*, Vol. 19, No. 1, p. 111–126, 2006 doi:10.1128/CMR.19.1.111–126.2006

**CROFT, S.L., Oliaro, P.** Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 1, No 10, 2011.

**DANTAS-TORRES, F. et al.** Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change .Trends in Parasitolog. 1820, p. 5

**DA SILVA, E.F. et al.** Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 37 (2002) 979\_ 984.

**DI-BLASI, T.** A complexidade da interação *Leishmania*-flebotomíneo: Do estudo de moléculas envolvidas na adesão do parasita ao tubo digestivo à análise do papel de citocinas-*like* na modulação da resposta imune do vetor. 2016. P 104. Tese de doutorado – Instituto Oswaldo cruz (FIOCRUZ) , Rio de janeiro, pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016

**DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi).** Disease Factsheet: Leishmaniasis. 2019<sup>a</sup>. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>> Acessado em 14/12/2019.

**DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi).** Disease Factsheet: Cutaneous Leishmaniasis. 2019<sup>b</sup>. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>> Acessado em 14/12/2019.

**DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi).** Infoleish:Boletim informativo da rede leish- 3 edição. 2018. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>> Acessado em 14/12/2019.

**DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi) – site.** Leishmaniasis. Disponível em <<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>> Acessado em 14/12/2019.

**ESPINOSA, O.A., et al.** An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, p. 1-13, 2016. doi:10.1017/S0031182016002092

**FIOCRUZ.** Projeto Saúde e Meio ambiente: As leishmanioses. 1997. Disponível em: <[http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist\\_rico.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm)>. Acessado em 14/12/2019.

**FIOCRUZ.** Parecer Técnico Científico - Miltefosina para Tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana: Evidências de eficácia e segurança. Brasília, 2015, 42p.

**GOZZI, G.J.** et al. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2) PLoS ONE 2015 10(6): e0130046. doi:10.1371/journal.pone.0130046

**HALDAR, A.K.** Sen, P., Roy, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International* Volume 2011

**HANDMAN, E.** Cell biology of leishmania. *Advances in parasitology*, vol 44, p. 1-39, 1999.

**KARAKUŞ, M.**, et al. The impact of refugees on leishmaniasis in Turkey: a new Syrian/Turkish *Leishmania tropica* population structure described by multilocus microsatellite typing (MLMT). *Parasitology Research*, 2019 <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06392-w>

**KASZAK I.**, Planellas M., Dworecka-Kaszak B. Canine leishmaniosis – an emerging disease. *Annals of Parasitology*, Vol 61, No 2, 2015, pág. 69–76.

**LIRA, B.F.** Síntese e caracterização de novos derivados mesoiônicos para aplicação de óptica linear e atividade biológica. 2004. P 344. Tese de doutorado – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, pós-graduação em Química, 2004.

**LOW, G.C.**, et al. The history of the use of intravenous injections of tartar emetic (antimonium tartaratum) in tropical medicine. *Society of tropical medicine and hygiene*, 1916, pág. 37 -42.

**LUIS, J.A.S.** et al. Synthesis and preliminary *ex vivo* evaluation of the spasmolytic activity of 1,3-thiazolium- and 1,3,4-thiadiazolium-5-methylthio- and 5-thioacetate derivatives. *Acta Pharm.* 64 (2014) 233–245

**MAPA.** Nota Técnica Nº 11/2016. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/notas-tecnicas/nota-tecnica-no-11-2016-cpv-dfip-sda-gm-mapa-de-1-09-2016.pdf/view>>. Acessado em 14/12/2019.

**MARCONDE M., DAY, M.J.** Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science* 123 (2019) 261–272

**MENDEZ-SANCHEZ, S.C.** et al. The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: A relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. *Chemico-Biological Interactions* 179 (2009) 125–130.

**MUSKUS, C. E., MARÍN VILLA, M.** Metacicloogénesis: um processo fundamental em la biologia de *Leishmania*. *Biomédica*, 22 (2), p 167-177, 2002. doi:10.7705/biomedica.v22i2.1156

**GRYNBERG, N., SANTOS, A.C., Echevarria, A.** Synthesis and in vivo antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-cancer drugs* 1997, 8, pp 88-91

**OLIVA, G.** et al Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Vet Med Today: Reference Point JAVMA*, Vol 236, No. 11, June 1, 2010

**OLIVEIRA, C.S.**, et al. Drug Resistance Modulation in *Staphylococcus Aureus*, a New Biological Activity for Mesoionic Hydrochloride Compounds. *Molecules* 2011, 16, 2023-2031; doi:10.3390/molecules16032023

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS).** Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. Série de informes técnico 949, Ginebra, 2010.

**ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE (OPAS).** Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Americas. Washington, D.C.: OPAS; 2019<sup>a</sup>.

**ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICADA DA SAÚDE (OPAS).** Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPAS; 2019<sup>b</sup>. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>> Acessado em 14/12/2019.

**PENNISI, M.G.**, et al. Leishmaniosis in cats: Abcd guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, vol. 15, p.638–642, 2013.

**PENNISI, M.G.**, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors* (2015)vol 8 n302 .

**PIRES, A.R.A** et al. Comparative study of the effects of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions* 186 (2010) 1–8

**PIRES, A.R.A** et al. Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity: Involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions. *Chemico-Biological Interactions* 189 (2011) 17–25

**PIRES, A.R.A** et al. Antioxidant effect of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives on isolated mitochondria. *European Journal of Pharmacology* 770(2016)78–84.

**POORRAJAB, F.**, Forouzannia, S.K, Tabatabaee, S.A. Novel immunomodulatory function of 1,3,4-thiadiazole derivatives with leishmanicidal activity. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1968–1978.

**POORRAJAB, F.** et al. Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: Synthesis and in vitro biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 1758e1762.

**RIBEIRO, R.R.**, et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, p.12, 2018.

**RODRIGUES, R.F.**, et al. A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania* sp. and toxicity evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42 (2007) 1039e1043.

**RODRIGUES, R.F,** et al. Antileishmanial Activity of 1,3,4-Thiadiazolium-2-Aminide in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Feb. 2009, p. 839–842.

**RODRIGUES, R.F** et al. The in vivo activity of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide compounds in the treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Advance Access published October 10, 2011.

**RODRIGUES, R.F** et al. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (2012) 1760–1766.

**SEIFERT, K., CROFT., S.L.** *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50, No. 1, 2006, p. 73–79.

**SEFFF-RIBEIRO, A.** et al. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Research* 2003, Vol 13 No 5

**SEFFF-RIBEIRO, A.** et al. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure–activity relationship study. *Anti-Cancer Drugs* 2004a, Vol 15 No 3

**SEFFF-RIBEIRO, A.** Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. *British Journal of Cancer* (2004b) 91, 297 – 304

**SERAFIM, T.D.,** et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, vol. 3, p.548–555, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>

**SERBAN, G.** Future Prospects in the Treatment of Parasitic Diseases: 2-Amino-1,3,4-Thiadiazoles in Leishmaniasis. *Molecules* 2019, 24, 1557

**SOARES-BEZERRA, R.J.** et al. Effect of mesoionic 4-phenyl-5-(cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride derivative salts on the activities of the nitric oxide synthase and arginase of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, June 2008; 23(3): 328–333

**SOARES-BEZERRA, R.J.** et al. In vitro evaluation of 4-phenyl-5-(40-X-phenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides and 3[N-40-X-phenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate derivatives on nitric oxide synthase and arginase activities of *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology* 135 (2013) 50–54.

**STEVERDING, D.** The history of Leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, p. 10-82, 2017. doi 10.1186/s13071-017-2028-5

**TEIXEIRA, D.E.,** et al. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, p.64, 2013.

**TORRES-GUERRERO, E,** et al. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved] *F1000Research*, 2017.



**VIANNA, G.** Boletim da 4ª sessão ordinária da Sociedade Brasileira de Dermatologia de 24 de abril de 1912. *Archivos Brasileiros de Medicina*, pág.422-436.

**ZULFIQAR, B., SHELPER, T.B., AVERY, V.M.** Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, 2017.