



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO 17-AAG PARA SUA
UTILIZAÇÃO COMO QUIMIOTERÁPICO NO TRATAMENTO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

LÍVIA BRITO COELHO FONTES

Salvador - Bahia

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO 17-AAG PARA SUA
UTILIZAÇÃO COMO QUIMIOTERÁPICO NO TRATAMENTO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

LÍVIA BRITO COELHO FONTES

Orientação: Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Co-orientação: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F683a Fontes, Livia Brito Coelho
Avaliação da segurança do 17-AAG para sua utilização como quimioterápico
no tratamento da leishmaniose visceral canina. / Livia Brito Coelho Fontes. - 2020.
74 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Deborah Bittencourt Mothé Fraga, Laboratório de
Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Faculdade de
Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação
Oswaldo Cruz, 2020.

1. Toxicidade. 2. Farmacocinética. 3. Cães. 4. Leishmaniose. I. Título.

CDU 616.993.161

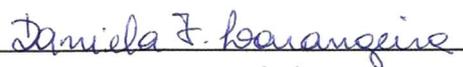
“AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE 17-AAG PARA SUA UTILIZAÇÃO COMO QUIMIOTERÁPICO NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA”.

LÍVIA BRITO COELHO FONTES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 04 de setembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Daniela Farias Lorangeira
Professora
UFBA



Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
FIOCRUZ



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Gladys e Moisés, à minha irmã Catarina, ao meu marido Everton, à minha tia Lêda e à minha avó Anália, por toda dedicação e amor para comigo. Em especial ao meu filho Joaquim, que tem sido o meu porto seguro, a razão da minha cura e transformação. À minha orientadora Deborah e amiga-irmã Bruna Leite que me acolheram e me acalentaram nos momentos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho:

À minha orientadora, Dra. Deborah Fraga, pela oportunidade de me acolher como orientanda, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo dedicado para realização do projeto. Além disso, pela sua amorosidade, paciência, compreensão e todo cuidado com todo o meu processo de formação na iniciação científica e mestrado.

À minha co-orientadora, Dra. Patrícia Veras, pelo tempo que também dedicou para realização desse trabalho, pelos valiosos ensinamentos e compreensão.

À Dr. Washington Conrado dos Santos e Dra Isadora Lima, colaboradores do projeto pelo tempo dedicado para me acompanhar nas análises de histopatologia.

À Marcos Ferrante por toda ajuda e ensinamentos fornecidos durante os experimentos e lida com os animais de experimentação.

Aos alunos de iniciação científica, Eder, Alice, Kaenna, Luana, Renata e Rebeca (Iniciação científica Júnior) que foram dedicados e empenhados no desenvolvimento do projeto.

À Bruna Leite, Maiara Arruda e Yuri Silva pela colaboração e ajuda durante o tratamento dos animais e escrita do trabalho.

À equipe de tratadores do IGM, Antônio e Diego por todo amor e cuidado dedicado aos animais durante os experimentos.

Aos motoristas do IGM, especialmente Sr. Amaro que estava sempre disposto a ajudar no transporte da equipe e dos animais.

À Isabele, administradora do Laiphe, pelo apoio administrativo.

Aos veterinários do Centro de Controle de Zoonoses, Adriana e Sandra, por permitirem a realização do projeto no município e por sempre nos apoiarem.

Aos amigos do Laiphe pelo apoio durante a realização do trabalho.

À Fiocruz e ao IGM, pela infraestrutura física e pessoal, que possibilitaram a execução do projeto.

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna, situada no Instituto Gonçalo Moniz pela ajuda na organização da dissertação.

Em especial, a todos os animais que foram utilizados para experimentação durante o projeto. Aqueles que tiveram o meu coração Sushi, Elisa e Zeca.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

FONTES, Livia Brito Coelho. Avaliação da segurança do 17-AAG para sua utilização como quimioterápico no tratamento da leishmaniose visceral canina. 2020. 741 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020

RESUMO

INTRODUÇÃO: No Novo Mundo, os cães são considerados o principal reservatório da leishmaniose visceral (LV). Devido às ineficiências nos tratamentos existentes e à falta de uma vacina eficaz, a eutanásia de cães é uma das principais estratégias de controle da doença, tornando obrigatório o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Anteriormente, nosso grupo mostrou que o 17-AAG, um inibidor de HSP90, demonstrou potencial para uso no tratamento da leishmaniose. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo testar a segurança do 17-AAG em cães, avaliando a farmacocinética plasmática, a proporcionalidade à dose e a tolerabilidade do 17-AAG em resposta a uma ou várias doses intravenosas (IV) em cães saudáveis. **MATERIAL E MÉTODOS:** Dois protocolos de pesquisa foram usados. Protocolo 1 (P1): cães saudáveis receberam doses variáveis (50, 100, 150, 200 ou 250 mg/m²) de 17-AAG ou placebo (n = 4) endovenoso, usando um desenho cross-over com período de “wash-out” de sete dias entre os tratamentos. O protocolo 2 (P2) envolveu nove cães saudáveis que receberam três doses de 150 mg/m² de 17-AAG administradas IV em intervalos de 48 horas. **RESULTADOS:** Todos os cães completaram com sucesso ambos os protocolos. Em P1, o 17-AAG foi bem tolerado, no entanto, foram observados níveis aumentados de enzimas hepáticas e diarreia em todos os quatro cães que receberam dosagem de 250 mg/m². Os parâmetros concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) e área sob a curva (AUC) foram proporcionais à dose administrada entre as doses de 50 e 200 mg/m². Em relação ao P2, o 17-AAG foi considerado bem tolerado em doses múltiplas de 150 mg/m². Níveis aumentados de enzimas hepáticas e diarreia foram observados em 3/9 e 1/9 desses cães, respectivamente. Nossos resultados demonstraram segurança para realização do teste de eficácia do 17-AAG em cães com LV quando administrado em concentrações iguais ou inferiores a 150 mg/m² em intervalos de 48 horas. Mas que a hepatotoxicidade observada com o esquema de dosagem intervalado apesar de ser reversível aponta para esforços para redução da toxicidade como a utilização de nanoformulações ou lipossomas.

Palavras-chave: Toxicidade; Farmococinética; Cães; Tanespimicina.

FONTES, Livia Brito Coelho. Avaliação da segurança do 17-AAG para sua utilização como quimioterápico no tratamento da leishmaniose visceral canina. 2020. 74 f. Dissertation (Master in Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020

ABSTRACT

INTRODUCTION: In the New World, dogs are considered the main reservoir of visceral leishmaniasis (VL). Due to inefficiencies in existing treatments and the lack of an effective vaccine, euthanasia in dogs is one of the main strategies for controlling the disease, making the development of new therapeutic interventions mandatory. Previously, our group has shown that 17-AAG, an HSP90 inhibitor, has demonstrated potential for use in the treatment of leishmaniasis. **OBJECTIVE:** The present study aimed to test the safety of 17-AAG in dogs, evaluating the plasma pharmacokinetics, dose proportionality and tolerability of 17-AAG in response to one or more intravenous (IV) doses in healthy dogs. **MATERIAL AND METHODS:** Two research protocols were used. Protocol 1 (P1): healthy dogs received variable doses (50, 100, 150, 200 or 250 mg / m²) of 17-AAG or placebo (n = 4) intravenously, using a cross-over design with a wash-out period seven days between treatments. Protocol 2 (P2) involved nine healthy dogs that received three doses of 150 mg / m² 17-AAG administered IV at 48 hour intervals. **RESULTS:** All dogs successfully completed both protocols. At P1, 17-AAG was well tolerated, however, increased levels of liver enzymes and diarrhea were observed in all four dogs that received a dosage of 250 mg / m². The parameters maximum plasma concentrations (C_{max}) and area under the curve (AUC) were proportional to the dose administered between the doses of 50 and 200 mg / m². Regarding P2, 17-AAG was considered to be well tolerated at multiple doses of 150 mg / m². Increased levels of liver enzymes and diarrhea were observed in 3/9 and 1/9 of these dogs, respectively. **CONCLUSION:** Our results demonstrated safety for conducting the 17-AAG efficacy test in dogs with VL when administered in concentrations equal to or less than 150 mg / m² at intervals of 48 hours. However, the hepatotoxicity observed with the interval dosing scheme, despite being reversible, points to efforts to reduce toxicity such as the use of nanoformulations or liposomes.

Keywords: Toxicity; pharmacokinetics; dogs; tanespymicin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	14
Figura 2 - Preparo da formulação de 17-AAG a 1% para administração sistêmica.....	34
Figura 3 – Esquema de administração de doses de 17-AAG com escalonamento em cães saudáveis e avaliações realizadas nestes animais em cada etapa (Estudo I).....	35
Figura 4 – Relação entre o peso e superfície em cães.....	35
Figura 5- Esquema de administração de múltiplas doses de 17-AAG em cães saudáveis e avaliações posteriores ao tratamento (Estudo II).....	36
Figura 6- Formulações sistêmicas preparadas para uso intravenoso: A) 17-AAG a 1% e B) Placebo.....	41
Figura 7 - Proporcionalidade entre a doses de 17-AAG e a AUC plasmática após a administração endovenosa em cães. A - Doses de 50 a 200mg/m ² ; B – de Doses 50 a 250mg/m ²	43
Figura 8 – Distribuição da concentração plasmática de 17-AAG avaliada até 12 horas após administração endovenosa, por infusão contínua em cães durante 30 minutos.....	44
Figura 9 - Concentração de 17-AAG no plasma e no líquido subcutâneo em cães avaliada até 105 horas após administração endovenosa de múltiplas doses.....	46
Figura 10 - Corte histológico do rim demonstrando degeneração vacuolar do epitélio tubular renal em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x)	50
Figura 11 - Corte histológico do fígado demonstrando mobilização de célula de Kupffer em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x).....	50

Figura 12 - Corte histológico do baço demonstrando hiperplasia plasmocitária e desorganização do baço tipo II/III em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x).....51

Figura 13 A e B- Cortes histológicos do intestino grosso demonstrando colite em animal tratado com 17-AAG (A- aumento de 4x/ B- aumento de 40x).....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados no preparo da formulação de 17-AAG para tratamento sistêmico de administração endovenosa.....	32
Tabela 2 - Fórmula utilizada na produção da formulação de 17-AAG a 1% para tratamento sistêmico.....	33
Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG em cães após administração endovenosa de diferentes concentrações deste em cães.....	42
Tabela 4 - Efeitos adversos observados em cães saudáveis após administração de 17-AAG por via intravenosa em diferentes concentrações.....	45
Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG no líquido intersticial subcutâneo após 3 administrações endovenosas em cães de 150mg/m ² com intervalos de 48 horas.....	47
Tabela 6- Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG no plasma após 3 administrações endovenosas em cães de 150mg/m ² com intervalos de 48 horas.....	47
Tabela 7- Efeitos adversos apresentados após múltiplas administrações na dose de 150mg/m ²	48
Tabela 8- Alterações histopatológicas em tecidos dos cães eutanasiados após múltiplas administrações do 17-AAG.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (atual IGM)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DPP	Plataforma de Duplo Percurso
ELISA	Ensaio e imunoabsorção enzimática
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
ICC	Índice de Correlação Intraclasse
IgG	Imunoglobulinas G
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
N	Amostra
NNN	Meio de Cultura
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação da Cadeia da Polimerase quantitativa
ROC	Curva Recebedora das Características dos Operadores
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	LEISHMANIOSES.....	12
1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	12
1.3	AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	13
1.4	HOSPEDEIROS.....	15
1.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	15
1.6	DIAGNÓSTICO DE LVC.....	16
1.7	TRATAMENTO DE CÃES COM LVC.....	19
1.7.1	TRATAMENTO DE CÃES COM LVC NO BRASIL.....	20
1.7.2	TRATAMENTO DE CÃES COM LVC NO MUNDO.....	21
1.8	ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO	23
1.9	INIBIDORES DA HSP90.....	23
1.10	ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO COM 17-AAG CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	24
1.11	ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E TOLERÂNCIA	25
1.12	FARMACOCINÉTICA E SEGURANÇA COM O USO DO 17-AAG EM HUMANOS	26
1.13	SEGUIMENTO DE ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E TOLERÂNCIA EM ANIMAIS ..	27
1.14	EXAMES LABORATORIAIS COMO MARCADORES DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO...	29
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	30
2.1	HIPÓTESE DO TRABALHO.....	31
3	OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE 17-AAG PARA TRATAMENTO SISTÊMICO	32
4.2	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS	34
4.2.1	DESENHO EXPERIMENTAL	34
4.2.2	BEM-ESTAR ANIMAL.....	36
4.2.3	ANIMAIS INCLUÍDOS NO ESTUDO	37
4.2.3.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS CÃES NO ESTUDO.....	37
4.2.4	MANEJO.....	37
4.2.5	ADMINISTRAÇÃO DO 17- AAG.....	38
4.2.6	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E TOXICIDADE NOS ESTUDOS I E II	38
4.2.7	AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA NOS ESTUDOS I, II	39
4.2.7.1	COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	39
4.2.7.2	COLETA DE LIQUIDO INTERSTICIAL SUBCUTÂNEO	39
4.2.7.3	DETERMINAÇÃO DE 17-AAG POR HPLC.....	40
4.3.8	ANÁLISE DE DADOS.....	41
5.	RESULTADOS.....	41

5.1	RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO I COM ADMINISTRAÇÃO ÚNICA DE 17-AAG INTRAVENOSA EM ESCALONAMENTO DE DOSES	42
5.1.1	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE 17-AAG NO PLASMA	42
5.1.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE 17-AAG POR VIA INTRAVENOSA EM ÚNICA DOSE UTILIZANDO ESCALONAMENTO DE DOSES	44
5.2	ESTUDO II- AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE DO 17-AAG EM CÃES SAUDÁVEIS APÓS ADMINISTRAÇÕES DE MÚLTIPLAS DOSES	46
5.2.1	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE 17-AAG NO PLASMA E NO LÍQUIDO INTERSTICIAL SUBCUTÂNEO	46
5.2.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE 17-AAG APÓS ADMINISTRAÇÕES DE DOSES MÚLTIPLAS	47
5.2.3	HISTOPATOLOGIA DOS TECIDOS DOS ANIMAIS APÓS O ESTUDO II	48
6.	DISCUSSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são zoonoses de grande importância para saúde pública e amplamente distribuídas no mundo. Essas doenças afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina e estão associadas com desnutrição, precariedade na moradia, população desfavorecida e seu deslocamento, sistema imune deficitário. Cerca de 1 bilhão de pessoas correm o risco de se infectar com *Leishmania* nas áreas endêmicas. Globalmente, a leishmaniose está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas, 0,9 a 1,6 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes a cada ano (WHO, 2018). As leishmanioses são endêmicas em 98 países ou territórios e há relatos de casos em outros 200 países. Dentre os países endêmicos para leishmanioses, 68 países são endêmicos para leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), apenas 9 países são endêmicos para LV e 21 países somente para LC (WHO, 2018).

No Brasil, temos maior incidência de casos humanos de leishmaniose cutânea e muco cutânea relacionadas com as espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, em relação a LV provocada pela *Leishmania infantum* que apresenta incidência menor de casos. Porém, em pacientes com LV são observados altos índices de mortalidade (ALVAR et.al., 2012). A LV é classificada como uma doença zoonótica no Brasil, onde é causada pela *Leishmania infantum*, tendo como seu principal vetor o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*. O cão (*Canis familiaris*) é considerado como o principal reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico, contribuindo para a manutenção do ciclo da LV (FRANÇA-SILVA et al., 2005; TEIXEIRA-NETO et al., 2014). No cão, a leishmaniose visceral (LVC) é de evolução lenta e de início insidioso, sendo esta uma doença de grande importância na saúde pública e veterinária (SHAW; LANGTON; HILLMAN, 2009).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

A leishmaniose visceral canina foi descoberta em 1908 por Nicole e Comte na região da Tunísia (NICOLE e COMTE, 1908). A partir de então, diversos estudos mostram que o homem e o cão compartilham o mesmo agente etiológico, sendo o cão classificado como o principal reservatório urbano da LV (ADLER e THEODOR, 1932;

ALVAR et al., 2004). Existem algumas evidências de que os cães possam ser considerados como importantes reservatórios da *L. infantum*: a) dos 98 países com a presença de LV, cerca de 50 desses possuem casos de LVC (ALVAR et al., 2012; BRASIL,2014;), b) elevado parasitismo cutâneo de cães infectados que pode funcionar como fonte de infecção para o vetor (MOLINA et al., 1994); c) o fato da infecção canina geralmente preceder o aparecimento de casos humanos, sendo ainda, mais prevalente que a doença humana (BEVILACQUA et al., 2001; ALVAR et al., 2004, SHERLOCK, 1996, SILVA et al., 2005), e d) principalmente pelo seu convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006). É possível que uma parte da população canina, principalmente em áreas endêmicas, não apresente manifestações clínicas clássicas da doença, mas alberguem o parasito na derme, podendo estes animais desempenhar um papel importante na introdução, dispersão e manutenção da doença em áreas urbanas (MOLINA et al., 1994; GUARGA et al., 2000).

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

O agente etiológico da leishmaniose é o protozoário do gênero *Leishmania* pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (ROSS et al., 1903). A *Leishmania* é considerada um parasita heteróxico, uma vez que completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vetor invertebrado (flebotômico) que abriga a forma infectante promastigota e um mamífero onde a forma amastigota (intracelular) se desenvolve e replica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotômicos, são considerados os vetores da *Leishmania* (NEVES, 2006). No Brasil, a espécie de maior importância epidemiológica na transmissão de LV é a *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON, 2010).

A principal forma de transmissão do parasito é através da picada da fêmea de flebotômico e regurgitação de formas promastigotas metacíclicas infectantes no hospedeiro (KILLICK-KENDRICK, 1981; NEVES, 2006). Durante o repasto sanguíneo pelo inseto vetor em um hospedeiro infectado, são adquiridas células do sistema fagocítico-mononuclear, que estão presentes na pele no hospedeiro vertebrado e dentro dessas células, encontram-se as formas amastigotas do parasito (KILLICK-KENDRICK, 1999). A *Leishmania* no interior do vetor, diferencia-se em vários estágios de desenvolvimento conforme migra dentro do intestino do inseto (DESCOTEAUX e

TURCO, 1999; KAMHAWI, 2006). Após cerca de 6-9 dias de ocorrido o repasto sanguíneo, os parasitos completam seu desenvolvimento no tubo digestório dos insetos, transformando-se da forma amastigota em forma promastigota (RUSSEL e WRIGHT, 1988). As promastigotas metacíclicas são consideradas as formas infectantes e são regurgitadas na derme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 1999; KAMHAWI, 2006). Após o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, os parasitos são fagocitados por macrófagos e no interior destas células, as formas promastigotas internalizam seu flagelo e se diferenciam em formas amastigotas (CARDOSO e CABRAL, 1999). Estas se multiplicam por divisão binária até a morte e o rompimento do macrófago infectado. As amastigotas liberadas poderão ser novamente fagocitadas (KILLICK-KENDRICK, 2002).

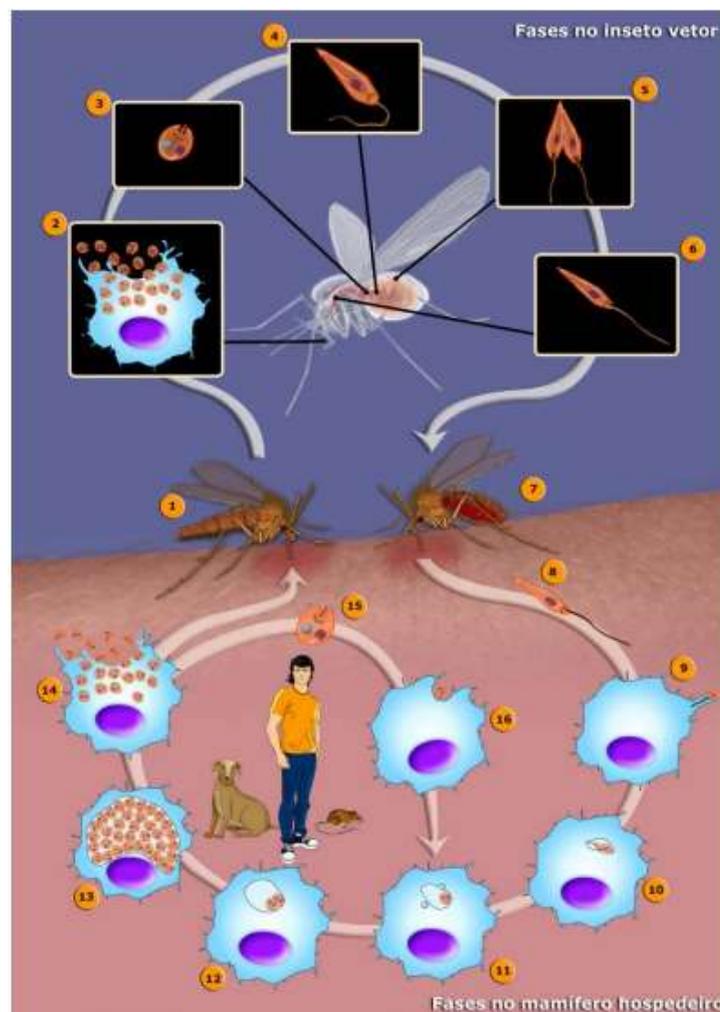


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro. 1: Flebotomíneo; 2 e 3: *Leishmania* na forma amastigota; 4: *Leishmania* na forma promastigota procíclica; 5: multiplicação da forma promastigota; 6: *Leishmania* na forma

promastigota metacíclica (forma infectante); 7: fêmea de flebotomíneo infectada e ingurgitada; 8: repasto sanguíneo e infecção do mamífero; 9: infecção de células por *Leishmania*; 10: formação de vacúolo parasitóforo; 11: diferenciação de promastigota para amastigota; 12 e 13: divisão binária de amastigotas; 14: ruptura do macrófago; 15: invasão de novos macrófagos por amastigotas / sucção de formas amastigotas por flebotomíneos fêmeas. (Fonte: Teixeira et al., 2013)

1.4 HOSPEDEIROS

As leishmanioses podem ser categorizadas de acordo com a fonte da infecção humana como: a) leishmaniose zoonótica, na qual os reservatórios são animais silvestres, comensais ou animais domésticos e b) leishmanioses antroponóticas, nas quais o reservatório é o ser humano.

A *Leishmania infantum* acomete os mamíferos em geral, sendo os reservatórios mais comuns os cães (*Canis familiaris*) no Novo Mundo e canídeos não domésticos (*Cerdocyon thous*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) (WHO, 2010).

O principal reservatório doméstico é o cão, e a ocorrência de LVC está relacionada diretamente com a ocorrência da infecção humana (MOLINA et al. 1994).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Nos cães, a LV é uma doença sistêmica de caráter crônico e os animais infectados podem apresentar uma forma subclínica da doença ou um quadro clínico severamente debilitante (ALEXANDER, SATOSKAR e RUSSELL, 1999; GONTIJO e MELO, 2004; MARZOCHI et al., 1985). Os cães que desenvolvem o quadro clínico da doença podem manifestar uma alta variabilidade de sinais clínicos que vão desde sinais discretos até sinais intensos e disseminados, alguns dos quais assemelham-se aqueles presentes na doença humana (AGUIAR et al., 2007; AZEVEDO et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999). Postula-se que a população canina em áreas endêmicas é composta por três grupos mutuamente exclusivos de hospedeiros: os cães que são susceptíveis; os cães que são resistentes e aqueles que estão em fase de latência, aparentemente resistentes, mas que tornam-se susceptíveis (BURATTINI et al., 1995; DYE, 1996; GRIMALDI et al., 2012). A evolução da doença depende de diversos fatores como a virulência do parasito, a susceptibilidade genética do hospedeiro e os mecanismos imunológicos desencadeados após a infecção (REINER e LOCKSLEY, 1995).

Os cães com LVC podem apresentar sinais clínicos inespecíficos, desde manifestações cutâneas até manifestações viscerais, afetando órgãos internos,

tecidos ou fluido corporal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), (FOGLIA MANZILLO et al., 2013). Os principais sinais clínicos descritos na literatura como mais frequentes são a onicogribose, alopecia, úlceras, conjuntivite, além de alterações resultantes do acometimento interno de órgãos como o baço (esplenomegalia), o fígado (hepatomegalia) e os linfonodos (linfadenomegalia) (GRIMALDI et al., 2012; METTLER et al., 2005; VERÇOSA et al. 2008).

A onicogribose é uma manifestação clínica que ocorre devido ao intenso processo inflamatório mononuclear na matriz da unha e não está associada necessariamente a ocorrência de parasitismo intenso (KOUTINAS, et al.2010). A alopecia e ocorrência de úlceras na pele dos cães com LVC ocorre devido a vulnerabilidade de diferentes áreas da pele a traumas mecânicos e/ou alterações vasculares. A conjuntivite ocorre devido a resposta exacerbada do sistema imune a presença de *Leishmania* com a formação de complexos imunes, inflamação granulomatosa das glândulas lacrimais e meibomianas. A hepatomegalia na LVC ocorre devido ao parasitismo de células de kuppfer e hepatócitos, com presença de infiltrado inflamatório e hipertrofia e hiperplasia de células residentes. A esplenomegalia e a linfadenomegalia ocorrem na LVC devido a depleção de linfócitos T e uma exuberante proliferação de linfócitos B com consequente hiperglobulinemia (KOUTINAS, et al.2014). O agravamento destes sinais clínicos em conjunto pode levar o animal a óbito (ALVAR et al., 2004; GREENE et al. 2006).

Alguns cães após a infecção por *Leishmania* não desenvolvem sinais clínicos, ficam assintomáticos. Existem controvérsias sobre o potencial transmissor destes animais, em relação a *Leishmania infantum* para o vetor. Alguns autores mostraram que os cães assintomáticos, não têm potencial transmissor do parasito para o vetor (VERÇOSA et al., 17 2008) ou apresentam menor capacidade que os sintomáticos (da COSTA et al., 2006; SOARES et al., 2011). Finalmente, existem estudos que demonstraram que não existe correlação entre a quantidade de sinais clínicos presentes no cão e a capacidade de transmitir o parasita ao vetor (GUARGA et al., 2000; LAURENTI et al., 2013; BORJA, et al. 2016; MAGALHAES-JUNIOR et al., 2016).

1.6 DIAGNÓSTICO DE LVC

O diagnóstico clínico da LVC é pouco preciso em razão dos sinais clínicos não serem patognomônicos da doença. Além disso, o diagnóstico clínico se torna mais

complicado devido a ocorrência de animais que possuem outras infecções como babesiose, erliquiose, tripanossomíase, que têm sinais clínicos muito semelhantes, assim como cães assintomáticos que estão infectados e não apresentam sintomatologia. Dessa forma, o diagnóstico clínico isoladamente não é suficiente para identificar um cão infectado (CAMARGO; LANGONI, 2006), sendo imprescindível a utilização de exames laboratoriais para confirmação diagnóstica (BRASIL, 2006).

Os métodos parasitológicos consistem na visualização direta ou indireta do parasita, fornecendo uma prova definitiva de que o animal está infectado. A pesquisa parasitológica direta pode ser feita em esfregaços de medula óssea, de linfonodo e de baço ou ainda por *imprint* de lesões na pele (FAYET, 1999; QUEIROZ et al., 2010). As amastigotas do parasita são identificadas por seu formato, que varia de esférico a ovóide, medindo cerca de 2 a 6 μm de diâmetro, contendo núcleo arredondado e cinetoplasto ligeiramente arredondado (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

A metodologia de diagnóstico direto por *imprint* ou esfregaços apresenta alta especificidade, porém sua sensibilidade é baixa, com cerca de 50% em esfregaços de medula óssea, e decaindo para valores de 30% de sensibilidade em esfregaços de linfonodo. A baixa sensibilidade ocorre, pois os animais na fase inicial da doença podem apresentar resultados negativos (FAYET, 1999; PALTRINIERI et al., 2010).

Quando os parasitas não são visíveis no diagnóstico direto utilizam-se métodos parasitológicos indiretos, como a cultura realizada a partir de aspirados de baço, medula óssea e de linfonodos, através da utilização de meios específicos, como o Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), o RPMI-1640, o *Brain Heart Infusion* (BHI) (TROTZ-WILLIAMS; GRADONI, 2003, BARROUIN-MELO, et al 2004). As culturas são incubadas a temperatura de 24 a 26°C, sendo observadas semanalmente quanto à presença de promastigotas. O resultado final demora até 4 semanas, retardando o diagnóstico (DIETZE, 2005), apresentando riscos de contaminação por microrganismos e baixa sensibilidade (ALVAR, et al.2004).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) se baseia na amplificação de sequências específicas de nucleotídeos presentes no parasita, sendo um método bastante sensível e específico para detectar o DNA de *Leishmania* em uma ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; GOMES et al., 2007).

A utilização da PCR para avaliar o DNA extraído de amostras de pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos e baço, tem levado a um aumento

na capacidade de diagnosticar cães infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; NUNES et al., 2007). Isto pode ser comprovado em um estudo que utilizou aspirado de medula óssea, obtendo 100% de especificidade e 80% a 93% de sensibilidade. Esta sensibilidade é superior na PCR quando comparada aos métodos diretos e cultura de parasitas que apresentam sensibilidade entre 50 a 60% (TAVARES, et al., 2003). Outro estudo, realizado por Rampazzo et al. (2017), avaliou uma PCR duplex, com o objetivo de detectar DNA de *Leishmania infantum* e DNA do hospedeiro canino aprimorando o diagnóstico e confirmando a presença e qualidade do DNA utilizado em cada reação.

Uma das desvantagens do uso de técnicas moleculares é o elevado custo quando comparada a outras técnicas, dificultando a sua realização rotineiramente nos laboratórios oficiais e em inquéritos para detecção de LVC, por requerer laboratórios com equipamentos especializados, habilidade técnica e elevado custo, porém tem como vantagens as altas taxas de sensibilidade e especificidade, capacidade de quantificar a carga parasitária e a rapidez nos resultados (Roura et al., 1999; MOREIRA et al., 2007).

Alguns métodos sorológicos vêm sendo utilizados por anos na prática clínica e em inquéritos epidemiológicos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (EIA) (GRIMALDI et al., 2012). Os testes sorológicos de imunodifusão, imunomigração rápida e o teste de aglutinação direta também foram utilizados com menor frequência na rotina clínica (FAYET et al., 1999).

A RIFI é um método diagnóstico sorológico de baixa sensibilidade e especificidade. No entanto, este método foi por muitos anos indicado pelo Ministério da Saúde como teste diagnóstico confirmatório da leishmaniose visceral canina em seu protocolo de diagnóstico de LVC (FERROGLIO et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; SILVA et al., 2001). Diante da limitação de desempenho da RIFI, o Ministério da Saúde alterou o diagnóstico da LVC e acrescentou um teste imunocromatográfico rápido. Desta forma, o protocolo utilizando ELISA (EIE-Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos) como teste de triagem e RIFI (IFI-Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos) como teste confirmatório foi substituído pelo teste imunocromatográfico rápido DPP (rK28) como ferramenta de triagem associada ao ELISA (EIE-Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos) como teste confirmatório (NOTA TÉCNICA CONJUNTA nº 01/2011- CGDT- CGLAB/ DEVIT/ SVS/MS).

O teste imunocromatográfico rápido preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde emprega o antígeno recombinante rK28 tem apresentado vantagens em relação aos métodos sorológicos utilizados anteriormente, como maior precisão, interpretação simplificada dos dados, uso de volumes pequenos de amostra, e compatibilidade com diferentes tipos de fluidos corporais como sangue, soro, saliva, plasma e urina em testes para outras infecções (BOARINO, et al. 2005; FRAGA, et al 2016)

O ELISA preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde denominado EIE-Leishmaniose Visceral Canina utiliza como antígeno o lisado bruto de *Leishmania major*. Fraga et al. (2016) demonstraram que o teste EIE-LVC demonstrou sensibilidade de 79% e especificidade de 84% frente a um painel de 780 amostras de soro. Em outro estudo, Borja et al. (2018), o teste EIE-LVC apresentou sensibilidade mais baixa, de 67% e especificidade de 87%.

Algumas pesquisas têm buscado desenvolver ensaios de ELISA utilizando alguns antígenos recombinantes para melhorar a eficácia do diagnóstico de LVC (ALVES et al. 2004; BEVILACQUA et al., 2004). Trabalhos avaliando ELISA com a proteína rK28 com soros caninos, mostraram sensibilidade variando de 91% a 100% e especificidade de 100% (LAURICELLA et al., 2016; VENTURIN et al., 2015). Adicionalmente, um estudo recente de Borja et al. (2018) traz resultados promissores com a utilização de uma proteína recombinante do flagelo da *Leishmania infantum* (rLci5) no ELISA, que apresentou sensibilidade de 87%, especificidade de 94% e acurácia de 90% frente a um painel de soros, também testado pelo EIE – LVC que apresentou sensibilidade de 67%, especificidade de 87% e acurácia de 77%.

1.7 TRATAMENTO DE CÃES COM LVC

O tratamento de cães infectados é um grande desafio na rotina clínica veterinária, devido à ausência de medicamentos que levem a cura parasitológica de cães, o que permite a persistência do parasito no organismo do animal após o tratamento. Os cães tratados com os medicamentos disponíveis não apresentam cura parasitológica, mas sim redução ou suspensão dos sinais clínicos, com redução dos títulos de anticorpos e redução da carga parasitária em tecidos de predileção do parasito (PINHÃO, 2009; PEREIRA JUNIOR, 2014; REGUERA et al., 2016).

1.7.1 Tratamento de cães com LVC no Brasil

No Brasil é proibido realizar o tratamento de cães com drogas utilizadas para tratar humanos com leishmaniose visceral (Portaria nº 1.426, de 2008). No início de 2017, foi liberado o tratamento de cães com Miltefosina, tendo um fármaco veterinário chamado Milteforan®/Virbac, que está disponível comercialmente (Nota Técnica Conjunta nº001/2016 MAPA/MS). A miltefosina foi introduzida no tratamento da LVC no Sul da Europa há uma década (RIBEIRO et al., 2018), apresentando um efeito terapêutico tempo-dependente com redução de sinais clínicos. Por se tratar de um medicamento de uso recente no Brasil, estudos vêm sendo desenvolvidos para a avaliação de sua eficácia.

A miltefosina atua no metabolismo de lipídeos, com atividade sobre a membrana da *Leishmania*, acumula-se em macrófagos, sendo diretamente tóxica para o parasito. Este composto induz a ativação de macrófagos e células T, que produzem interferon gama, estimulando a produção de NO e radicais reativos de oxigênio dentro dos vacúolos dos macrófagos, eliminando os parasitos (BANETH & SHAW, 2002; MANNA et al., 2009; REGUERA, et al., 2016; NIETO et al., 2005).

Em estudos feitos por Manna et al. (2009) foi demonstrado que o tratamento com miltefosina reduziu a replicação do parasito, contudo, ele não foi completamente removido dos gânglios linfáticos, indicando que a ação da miltefosina para o tratamento da LVC parece ser ineficaz. Desta forma, sugeriram a utilização de uma combinação de miltefosina com outras drogas anti-leishmania na prática veterinária. Manna e colaboradores (2015), acompanharam durante seis anos, dois grupos de animais: um grupo (G1) tratado com antimonial pentavalente + alopurinol, e outro grupo (G2) tratado com miltefosina + alopurinol. Os achados clínicos e laboratoriais indicaram que o antimoniato de meglumina associado ao alopurinol tiveram melhor eficácia clínica do que a miltefosina associada ao alopurinol em cães com LV, tendo uma menor taxa de reincidências. Além disso, durante o tratamento com a miltefosina, vários efeitos colaterais foram relatados em cães, incluindo dor abdominal, vômitos, diarreia, anorexia (WOERLY et al., 2009) e potencial efeito teratogênico (DORLO et al., 2008).

Em um estudo publicado em 2019 realizado no Brasil, Dos Santos Nogueira e colaboradores, avaliaram a eficácia da miltefosina no tratamento da LVC em 35 cães realizando a quantificação da carga parasitária da pele e xenodiagnóstico. Foi demonstrada redução do score clínico em 94,2% dos animais tratados, redução

significativa da carga parasitária na pele em 98,75% dos animais e, conseqüentemente, diminuição da infectividade. Em diversos trabalhos utilizando o protocolo terapêutico com miltefosina é possível perceber que não há cura parasitológica, sendo o grande entrave de sua utilização na terapia da LVC (MANNA et al. 2009; MIRÓ et al. 2009; ANDRADE et al. 2011; MANNA et al. 2015). Por esse motivo, animais tratados devem ser acompanhados periodicamente pelo médico veterinário e fazer uso constante de métodos repelentes para o flebotomíneo, pois como não há cura parasitológica esses animais podem favorecer a manutenção do ciclo do parasito em áreas endêmicas (ANDRADE et al., 2011).

Apesar da liberação do tratamento de cães no Brasil com a miltefosina, este não apresenta uma eficácia excelente e ainda envolve um alto custo, selecionando somente tutores que tem alto poder aquisitivo que podem tratar e monitorar a doença durante o tratamento (DIAS et al., 2020).

1.7.2 Tratamento de cães com LVC no mundo

Em outros países, as mesmas drogas aplicadas no tratamento da LV são utilizadas no tratamento da LVC desde a primeira metade do século 20, variando sua posologia e via de administração (ALVAR et al., 2004). Dentre as drogas indicadas para o tratamento da LVC, destacam-se os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B convencional ou encapsulada em lipossomas, o alopurinol, a pentamidina e a miltefosina (ALVAR et al., 2004; MIRÓ, 2005; NIETO et al., 2005; REGUERA, et al. 2016).

Os antimoniais pentavalentes (SbV) são os medicamentos de primeira escolha prescritos por médicos veterinários, sendo largamente utilizados para o tratamento da LVC na Europa e em outras partes do mundo, exceto no Brasil (REGUERA et al., 2016). Eles agem inibindo enzimas de processos metabólicos essenciais do protozoário (BANETH e SHAW, 2002; MIRÓ, 2005), alteram o balanço redox do enxofre, que é responsável pela prevenção dos efeitos de espécies reativas de oxigênio (ROS) no parasita (WYLLIE et al., 2004). Apesar de ser amplamente utilizada na Europa, os cães não apresentam cura parasitológica, porém tem resultados superiores em relação a redução da carga parasitária e melhora clínica dos cães infectados quando comparada com outras drogas (MANNA, et al. 2015). Entretanto, os medicamentos à base de SbV não são isentos de limitações, como a via de administração parenteral e a ocorrência de efeitos colaterais como dor severa no local

da injeção (SLAPPENDEL e TESKE, 1997), ocorrência de fibrose muscular e abscessos (BANETH e SHAW, 2002), além de distúrbios gastrintestinais, nefrotoxicidade, irritação da pele e hiperproteinemia esporádica (VALLADARES et al., 1998), o que justifica a substituição desses compostos por outros mais seguros (BANETH e SHAW, 2002). Os antimoniais pentavalentes podem ser usados sozinhos (monoterapia), ou em combinação com outros medicamentos, como o alopurinol, enrofloxacina, metronidazol e miltefosina, para melhorar seu efeito leishmanicida, reduzir os efeitos colaterais e prevenir a ocorrência de recidiva (OLIVA et al., 2004). Vale ressaltar que a monoterapia com SbV não garante a remoção completa dos parasitos, sendo comum recidiva, especialmente se o tratamento for muito curto (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2010).

A anfotericina B (*Fungizone*®, Bristol-Myers Squibb, EUA) é considerada um medicamento de segunda linha para o tratamento da LVC no mundo. Esta droga é um antibiótico da classe dos poliênicos produzido a partir do *Streptomyces nodosus*. É primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de parasitos como a *Leishmania* (BANETH, 2006; LEMKE et al., 2005). O mecanismo de ação da Anfotericina B está baseado na ligação do fármaco ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania*. Nos mamíferos, a Anfotericina B se liga ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos do fármaco nestes. A ligação ao ergosterol provoca uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando a morte do parasito por lise osmótica (BANETH, 2006; LEMKE et al., 2005; NIETO et al., 2005). Os principais efeitos colaterais associados ao uso da anfotericina B, em pacientes caninos, estão relacionados com a velocidade de infusão do medicamento, a dose e a forma de administração. Geralmente ocorrem tremores, febre, náuseas, vômitos, anorexia, mialgias, artralgias, e perda de peso (NIETO et al., 2005). Além disso, o fármaco apresenta potencial efeito nefrotóxico. Durante o tratamento, pode ocorrer diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, e diminuição do *clearance* (NIETO et al., 2005). O uso de formulações lipossomais, tem conseguido diminuir essa toxicidade da droga (ALVAR et al., 2004; BANETH, 2006; BANETH & SHAW, 2002; NIETO et al., 2005).

O alopurinol é uma droga da classe das hipoxantinas, que metabolizada pela *Leishmania* produz um análogo inativo da inosina. Este análogo é incorporado ao RNA do parasito, causando síntese proteica errônea. O alopurinol é largamente usado na

terapia de LVC, sozinho ou em combinação com outras drogas, devido a sua baixa toxicidade, sua eficiência em proporcionar significativa remissão dos sinais clínicos, baixo custo e conveniência de ser administrado por via oral (BANETH e SHAW, 2002). Quando utilizado isoladamente, o alopurinol é incapaz de eliminar completamente a *Leishmania* de cães infectados (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; KUOTINAS et al., 2001), por isso representa o composto mais utilizado na Europa em protocolos de terapia combinada com uma droga leishmanicida (MATTIN et al., 2014). O alopurinol não danifica os glomérulos renais, entretanto, induz a formação de cristais de xantina em quase todos os cães tratados e, ocasionalmente urólitos (TORRES et al., 2011) que podem induzir secundariamente azotemia pós-renal e, ocasionalmente, disfunção renal (REGUERA et al., 2016).

Como descrito anteriormente, a atual tendência na terapêutica da LVC é a combinação de mais de um fármaco. Por outro lado, há uma busca constante por novas moléculas que sejam eficazes no tratamento da LVC (NIETO et al., 2005), levando a cura clínica e parasitológica a fim de evitar que o cão continue atuando como potencial reservatório da doença

1.8 ALTERNATIVAS PARA TRATAMENTO

Diante das falhas terapêuticas no tratamento da LVC, alta toxicidade, resistência do parasita as drogas, óbito pela doença e o alto custo existe a necessidade da descoberta de novos agentes quimioterápicos para maximizar os efeitos terapêuticos e redução dos efeitos colaterais. Esta crescente necessidade de novos tratamentos para leishmaniose, levou ao estudo de vários possíveis alvos, como os inibidores da proteína do choque térmico 90 (HSP90), que vêm sendo amplamente estudados no controle de infecções parasitárias, devido ao seu importante papel no controle do ciclo celular, adaptações a situações de estresse e virulência do parasito (HOMBACH e CLOS, 2014).

1.9 INIBIDORES DA HSP90

Atualmente, um dos possíveis alvos terapêuticos identificados tem direcionado as pesquisas para os inibidores da Proteína de Choque Térmico 90 (HSP90), que é uma proteína altamente abundante em protozoários, células de mamíferos e conhecida por ser induzida durante as respostas de stress. Estes inibidores podem ter potencial terapêutico e eles tem sido avaliados como possíveis drogas para compor o

esquema terapêutico da leishmaniose (PETERSEN et al., 2012). Os protozoários também expressam HSP90 assim como os mamíferos (FOLGUEIRA et al., 2007). A modulação de HSP90 por inibidores específicos ou pelo stress de choque térmico provoca profundas modificações nos processos de diferenciação do parasita (NATHAN et al., 1997). Dessa forma, por se mostrar essencial para a viabilidade do parasita, esta proteína vem sendo alvo para desenvolvimento de novos fármacos.

A HSP90 é uma chaperona termolábil, altamente conservada, que auxilia no dobramento correto e montagem de outras proteínas, evitando a formação de agregados proteicos por um possível dobramento incorreto (PRODRUMOU et al., 1997). A *Leishmania* expressa a HSP90 que participa no processo de diferenciação da forma promastigota em amastigota (FOLGUEIRA e REQUENA, 2007). Estudos mostraram que o sítio de ligação de ATP desta chaperona pode ser inibido por antibióticos da família das ansamicinas benzoquinonas, como a Geldanamicina (GA), o 17- (allylamino)-17- demethoxygeldanamycin (17-AAG) e o 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG) (PRODRUMOU et al., 1997; WHITESELL et al., 1994).

1.10 ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO COM 17-AAG CONTRA LEISHMANIA

A modulação de HSP90 por inibidores específicos ou pelo stress de choque térmico induz a parada no ciclo celular da *Leishmania*. A Geldanamicina (GA) foi um dos primeiros compostos naturais identificados como sendo capazes de inibir a atividade da HSP90 (Sharma et al., 1998; Neckers et al., 1999). Esta droga é um antibiótico natural derivado do fungo *Streptomyces hygroscopicus*. Estudos realizados por Li et al. (2009), mostraram que a inibição da HSP90 por GA foi capaz de induzir morte por apoptose de *L. donovani*. Contudo, a GA tem estabilidade in vivo limitada e ainda é um composto hepatotóxico, o que limita as chances dele se tornar uma droga comercial (SCHULTE e NECKERS, 1998).

O 17-AAG é um análogo da GA e foi o primeiro inibidor da HSP90 a ser utilizado em ensaios clínicos por apresentar menos toxicidade que a GA e possuir maior afinidade com o sítio de ligação do ATP e, conseqüentemente, ter maior poder inibitório sobre a HSP90 (SCHULTE E NECKERS, 1998). Petersen et al. (2012) e Santos et al. (2014), demonstraram o potencial efeito leishmanicida do 17-AAG em estudos *in vitro*. Esse efeito foi independente da produção de óxido nítrico (NO) e superóxido (O_2^-), e reduziu as concentrações de mediadores pró-inflamatórios,

incluindo TNF- α , IL-6 e MCP-1. Este achado é uma vantagem, uma vez que é claramente evidenciada a produção de mediadores pró-inflamatórios associado ao controle da infecção por *Leishmania* (LIESE, SCHLEICHER e BOGDAN 2008; MOLL, 1997). Isto demonstra que o 17-AAG afeta diretamente o parasita, sem estimular a resposta inflamatória dos macrófagos (PETERSEN et al., 2012). Além disso, em modelos *in vivo* utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, o uso do 17-AAG contribuiu para uma significativa redução da presença de parasitos na pele, mostrando um efeito similar ao da anfotericina B, que foi utilizada como controle positivo (SANTOS et al., 2014).

1.11 ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E TOLERÂNCIA

A farmacocinética clínica tem como foco principal a otimização de tratamentos farmacológicos, a fim de alcançar a máxima eficácia terapêutica com o mínimo de efeitos adversos (CALVO et al., 2002). Afinal, até mesmo a mais promissora das terapias farmacológicas irá fracassar em estudos clínicos se o fármaco for incapaz de alcançar uma concentração suficiente no seu órgão-alvo para exercer um efeito terapêutico (BACA e GOLAN, 2014).

A farmacocinética é definida como o estudo das concentrações de fármacos e seus metabólitos no corpo em função do tempo. Esta é composta pelos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (KRISHNAN e WHITE, 2013). Esses processos influenciam, cada um deles, o planejamento de um esquema posológico de um fármaco. A absorção é a transferência do fármaco do seu local de administração para o compartimento central (BUXTON e BENET, 2012), sendo uma etapa fundamental para determinar a via ou vias potenciais de administração, assim como, auxiliar na definição da dose ideal do fármaco. Comumente, um fármaco que é caracterizado por uma acentuada absorção evidenciada pela sua alta disponibilidade, necessita de uma dose mais baixa do que um fármaco pouco absorvido (BACA e GOLAN, 2014).

Depois da absorção, o fármaco se distribui para os líquidos intersticiais e intracelulares. Esse processo depende de fatores fisiológicos e das propriedades físico-químicas específicas de cada fármaco (BUXTON e BENET, 2012). Um fármaco de alta distribuição necessita de uma dose mais alta (BACA e GOLAN, 2014). Por outro lado, a taxa de eliminação de um fármaco influencia a sua meia-vida e, portanto, determina a frequência de doses necessária para manter os níveis plasmáticos

terapêuticos do fármaco (BACA e GOLAN, 2014). A compreensão dos fatores que determinam a capacidade de um fármaco de atuar em um determinado paciente e a compreensão da natureza mutável desses fatores com o decorrer do tempo, são de suma importância para o uso seguro e eficaz da terapia (BACA e GOLAN, 2014).

Os parâmetros farmacocinéticos são classificados em duas categorias: qualitativa e quantitativa. A primeira são os parâmetros observacionais como por exemplo, a concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) e a segunda requer cálculos, como por exemplo, o *Clearance* (CL) (FOSTER e VICINI, 2012). Dentre os diversos parâmetros, os mais utilizados nos estudos *in vivo* são: CL (mL/h/ kg), uma medida da habilidade do corpo eliminar a droga; Volume de distribuição (L/kg), volume do corpo que contém o composto; tempo de meia-vida ($T_{1/2}$, min), tempo necessário para reduzir a concentração da droga à metade no tecido em que está sendo avaliado, por exemplo o sangue; biodisponibilidade (F, %) que é a fração da droga que alcança a circulação sistêmica após a administração; concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$); tempo levado para alcançar a $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$); e a área sob curva em função do tempo (AUC) (FAN e DE LANNOY, 2014).

Para estimar os parâmetros farmacocinéticos podem ser utilizados dois modelos: não compartimentado ou compartimentado (EVANS, 2004). Na análise não compartimentada é possível fazer uma análise direta das concentrações, baseando-se nos momentos das observações e concentrações no tempo, isto é, na área sob a curva (AUC), podendo ser aplicado a qualquer conjunto de dados farmacocinéticos (DANSIRIKUL, CHOI e B. DUFFULL, 2005). Por outro lado, o modelo compartimentado visualiza o organismo como uma série de compartimentos farmacocineticamente distintos, cada um dos quais representando uma combinação de vários tecidos e órgãos que estão em equilíbrio químico (FAN e DE LANNOY, 2014). Geralmente, o modelo não-compartimentado é mais do que suficiente para descrever a evolução no tempo de novos compostos em animais e é o método mais frequentemente usado nas pesquisas pré-clínicas (EVANS, 2004).

1.12 FARMACOCINÉTICA E SEGURANÇA COM O USO DO 17-AAG EM HUMANOS

Os estudos de terapias anti-câncer com o 17-AAG iniciaram-se com o intuito de frear os estágios de carcinogênese com a inibição da Hsp90, afetando diretamente os processos envolvidos durante o início do câncer (Miyata, Nakamoto, & Neckers,

2013; Usmani, Bona, & Li, 2009). Foi demonstrado que apesar das células normais também possuem HSP90, o 17-AAG tem uma maior seletividade para células cancerígenas resultando assim na inibição de tumores (Xu et al., 2015). O 17-AAG foi amplamente investigado nos estudos pré-clínicos e pesquisa clínica como agente único ou em combinação/ nanocombinação com outros agentes anticancerígenos para diversos tipos de câncer (SCHULTE et al.1998; RAMANATHAN et al. 2007; BURRIS et al. 2011). Neste contexto, o 17-AAG exerce efeito anticancerígeno com as proteínas presentes nas vias de sinalização do tumor, essas proteínas clientes apresentam problemas de conformação devido a inibição da HSP90.

Em humanos foi avaliada a farmacocinética do 17-AAG, e foi demonstrado que o fármaco é metabolizado pelo citocromo P450 3A4/5 e NQ01 em 17- aminogeldanamicina (17-AG). O 17-AG é o metabólito ativo do 17-AAG e pode atuar inibindo a HSP90 (ERLICHMAN, 2009). A meia-vida do 17-AAG é de 3 a 6 horas e com o 17-AG foi observado uma meia vida de 6,2 a 7,6 horas. A excreção urinária do 17-AAG em humanos foi estimada para menos que 10% de uma dose, sendo esta rapidamente eliminada pelo sistema hepatobiliar (IYER et al., 2012; RICHARDSON et al., 2010). Estudos demonstraram que em humanos os efeitos adversos apresentados com a dose-limitante tóxica foram hepatotoxicidade com elevação de transaminases hepáticas e bilirrubina sérica (SAUSVILLE et al., 2003). Também foi possível observar sinais clínicos como náusea, diarreia e vômitos em pacientes tratados com o 17-AAG diluído em DMSO (SANTOS et al., 2003) e reações de hipersensibilidade com as formulações diluídas em cremophor, porém neste caso foram utilizadas medicações anti-histamínicas e corticóide antes da administração do 17-AAG (MODI et al.,2007).

1.13 SEGUIMENTO DE ESTUDOS DE FARMACOCINÉTICA E TOLERÂNCIA EM ANIMAIS

Durante o processo de elaboração de um fármaco realizamos estudos pré-clínicos, no qual são avaliados importantes parâmetros farmacocinéticos e um deles é a proporcionalidade de doses em diferentes espécies animais, este processo tem o intuito de validar o fármaco para a utilização em ensaios clínicos humanos. A proporcionalidade de doses ocorre quando o aumento da dose é acompanhado por aumento em uma medida de exposição como o AUC ou $C_{máx}$, podemos utilizar como exemplo a administração de um fármaco em diferentes doses e a observação de uma proporcionalidade na medição desse fármaco na concentração plasmática. Nos

estudos com proporcionalidade de doses podemos obter três resultados: I- a exposição é proporcional a dose; II- a exposição é menor que a dose proporcional; III- a exposição é maior que a dose proporcional. Quando temos um resultado proporcional de exposição e dose, significa que o fármaco está sendo depurado no mesmo intervalo da dose (GOUGH et al., 1995; SMITH et al.; 2000).

Outro parâmetro farmacocinético importante em estudos pré-clínicos são as medições de toxicidade do fármaco. Estes estudos são importantes para recolher informações sobre qual dose inicial administrar, o intervalo terapêutico a utilizar durante os ensaios clínicos e os potenciais efeitos adversos que poderão surgir (NUGENT et al., 2013). As doses para os ensaios toxicológicos pré-clínicos são determinadas a partir dos dados obtidos nos testes *in vitro* mediante as curvas dose-resposta, onde se determinam os parâmetros para estudos *in vivo* a dose máxima tolerada (MTD), a dose máxima possível (DMP), a dose letal 50 (LD50), a dose responsável pela saturação do órgão alvo e a dose limiar (DENNY e STEWART, 2013).

Nos estudos *in vivo* normalmente os dados farmacocinéticos são avaliados no plasma dos animais para explicar a eficácia clínica dos fármacos, porém nem sempre dados plasmáticos irão refletir os parâmetros de biodisponibilidade nos tecidos. Para suplantar essa limitação, na medicina veterinária existe um modelo experimental no qual é implantada uma caixa tissular no subcutâneo dos animais (CLARKE, 1989). Dentro das caixas tissulares implantadas fica o líquido intersticial subcutâneo que possui aproximadamente metade do percentual proteico do soro (BENGTSSON et al., 1984). Muitos estudos de farmacocinética na medicina veterinária utilizam o modelo experimental com a caixa tissular para avaliação da eficácia de antimicrobianos, pois este dispositivo permite quantificar a concentração do fármaco no líquido intersticial subcutâneo e inferir o quanto do fármaco está presente nos tecidos. Alguns fármacos podem se apresentar com baixa ou indetectável concentração plasmática após sua administração, porém o mesmo pode estar presente em ótimas concentrações por um determinado tempo nos tecidos, tendo um resultado promissor para o tratamento (GREKO, et al., 2003; STEGEMANN et al., 2006).

1.14 EXAMES LABORATORIAIS COMO MARCADORES DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO

Com o surgimento de estudos avaliando novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose visceral há necessidade da avaliação de possíveis marcadores farmacodinâmicos para monitorar e comparar a eficácia das terapias utilizadas.

De acordo com as orientações do LeishVet (2018), cães diagnosticados com leishmaniose visceral devem possuir sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais compatíveis com a doença. A partir do diagnóstico de LVC confirmado, esses cães devem ser estadiados (I, II, III ou IV) tendo como base a titulação sorológica, sinais clínicos, resultados laboratoriais de hemograma, ureia, creatinina, eletroforese de proteínas, urianálise e UPC (relação proteína por creatinina urinária), e PCR em tempo real utilizando amostras de medula óssea, linfonodo, baço, pele e/ou swabs conjuntivais (tecidos de primeira opção). Para monitoramento do tratamento, os animais devem ser acompanhados com periodicidade para avaliação de alguns parâmetros importantes como: anamnese e exame físico, hemograma, perfil bioquímico (dosagem de ALT-alanina aminotransferase, FA-fosfatase alcalina, ureia, creatinina, urianálise e UPC) e eletroforese de proteínas séricas, sorologia e PCR em tempo real (a cada 6 meses). Esses parâmetros devem ser analisados cuidadosamente em conjunto para que se possa avaliar a eficácia no tratamento e o prognóstico do indivíduo (LEISHVET, 2018).

Estes biomarcadores têm sido amplamente avaliados principalmente para o diagnóstico, porém ainda não foram validados para monitoramento clínico após o tratamento. Nas avaliações de farmacodinâmica, os biomarcadores diretos (DNA/RNA) são altamente específicos e parecem apresentar uma boa correlação com o desfecho clínico (OSMAN et al., 1997; DE VRIES et al., 2006; SUDARSHAN et al., 2011). Os marcadores indiretos mais promissores são os relacionados a macrófagos, sendo a ADA (RAI et al., 2011) e Neopterina (HAMERLINK et al., 2000), aqueles que apresentam maior sensibilidade e aplicabilidade geográfica, porém mais estudos são necessários para confirmação do potencial de prever o prognóstico clínico. As citocinas IL-10 e TNF- α se mostraram altamente sensíveis e parecem indicar o desfecho clínico, porém a sua baixa especificidade faz com que sejam necessários outros biomarcadores para o monitoramento da resposta terapêutica do paciente (GAMA et al., 2004; ANSARI et al., 2006).

Em uma revisão sistemática realizada por Kip e colaboradores em 2015, objetivou-se identificar possíveis marcadores para monitorar a resposta terapêutica em casos de leishmaniose visceral humana, leishmaniose cutânea humana e leishmaniose dérmica pós-kalazar. Os marcadores para leishmaniose visceral identificados foram: marcadores diretos para detecção de parasitos no sangue através de qPCR ou detecção de antígenos; marcadores indiretos relacionados com a infecção de macrófagos; citocinas; moléculas de superfície da célula e receptores circulantes; proteínas de fase aguda e outras proteínas

É de extrema importância que se avalie o potencial farmacodinâmico dos biomarcadores em humanos e animais, fazendo avaliações quantitativas relacionadas a parâmetros clínicos dos indivíduos em tratamento.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma prioridade de investigação. É uma doença classificada como zoonose e tem o cão como principal reservatório urbano (COSTA, 2011). É uma doença classificada como negligenciada por pesquisadores e agências de financiamento e as estratégias de controle da leishmaniose variaram pouco ao longo das últimas décadas, contudo, nos últimos anos houve avanços importantes em diagnóstico, tratamento e prevenção que podem alterar esse panorama.

No Brasil, é proibido realizar o tratamento de cães com drogas utilizadas em humanos com LV (Portaria nº 1.426, de 2008). Em 2016, foi liberado, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde (MS), o tratamento de cães com uma droga veterinária chamada Milteforan, que tem a miltefosina como princípio ativo (Nota técnica conjunta nº 001/2016 MAPA/MS). Woerly et al. (2009), demonstraram que o tratamento com a miltefosina teve efeito terapêutico tempo-dependente, com 61,2% de redução de sinais clínicos no dia 56. Contudo, os animais não apresentaram cura parasitológica, indicando que a ação da miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) é limitada (MANNA et al., 2009).

Os tratamentos em uso atualmente para cães infectados com *Leishmania infantum* apresentam alta toxicidade, alto custo e ineficiência dos protocolos (SOLANO-GALLEGO et al, 2009; PENNISI et al, 2005b; MANNA et al, 2008a). Com

essa problemática, nota-se a necessidade de identificação de novos agentes quimioterápicos que maximizem os efeitos terapêuticos e reduzam os efeitos colaterais.

Atualmente, as pesquisas têm sido direcionadas na busca de novos alvos, como os inibidores da Proteína de Choque Térmico 90 (HSP90), que é uma proteína altamente abundante em protozoários e células de mamíferos, conhecida por ser induzida durante as respostas de *stress* (PRODOMOU et al., 1997; FOLGUEIRA e REQUENA, 2007). A modulação de HSP90 por inibidores específicos ou pelo *stress* de choque térmico provoca profundas modificações nos processos de diferenciação do parasito (NATHAN et al., 1997). Dessa forma, por se mostrar essencial para a viabilidade do parasito, esta proteína vem sendo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Estudos mostraram que o sítio de ligação do ATP desta chaperona pode ser inibido por antibióticos da família das ansamicinas benzoquinonas, como a Geldanamicina, o 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) e o 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG) (PRODRUMOU et al., 1997; WHITESELL et al., 1994).

Um estudo *in vitro* feito por Petersen e colaboradores (2012), utilizando 17-AAG contra *L. amazonensis*, demonstrou seu alto potencial leishmanicida em concentrações de 125 a 500 nM. Os resultados mostraram ainda que a morte intracelular dos parasitos ocorreu independentemente da produção de óxido nítrico (NO) e superóxido (O^2), bem como mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e MCP-1. Além disso, Santos e colaboradores (2014) demonstraram em pesquisas *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, que o uso do 17-AAG contribuiu para significativa redução da presença de parasitos na pele.

Diante do exposto, o presente trabalho propôs avaliar o 17-AAG como quimioterápico para o tratamento da leishmaniose visceral canina, desenvolvendo uma formulação para administração endovenosa para o tratamento sistêmico em cães.

2.1 HIPÓTESE DO TRABALHO

O tratamento com o fármaco 17-AAG em cães infectados com *Leishmania infantum* é capaz de reduzir a carga parasitária, a ocorrência de sinais clínicos e as alterações laboratoriais provocadas pela LVC.

3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança de uso do 17-AAG como quimioterápico para o tratamento da leishmaniose visceral canina sob uso sistêmico endovenoso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Avaliar o perfil farmacocinético do 17-AAG, utilizando a via intravenosa com escalonamento de doses em uma única administração em cães saudáveis.

b. Avaliar a segurança e tolerância do 17-AAG utilizando a via intravenosa com escalonamento de doses em uma única administração em cães saudáveis.

c. Determinar a máxima dose tolerada com menos efeitos adversos em animais saudáveis.

d. Avaliar o perfil farmacocinético do 17-AAG no plasma e no líquido intersticial subcutâneo após múltiplas administrações por via intravenosa em cães saudáveis.

e. Avaliar a segurança e tolerância do 17-AAG após múltiplas administrações por via intravenosa em cães saudáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ELABORAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE 17-AAG PARA TRATAMENTO SISTÊMICO

A formulação para tratamento sistêmico com administração endovenosa, a base de Cremophor foi preparada de acordo com formulação descrita por Burris et al. (2011), que foi escolhida dentre outras na literatura, por apresentar simplicidade no preparo e baixo custo. Os reagentes utilizados no preparo da formulação de administração endovenosa estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes utilizados no preparo da formulação de 17-AAG para tratamento sistêmico de administração endovenosa

Nome comercial	Sinônimo	Número de CAS	Lote	Marca
17-AAG	Tanespimycin	75747-14-7	BAE-107	LC Laboratories
Kolliphor	Cremophor	61791-12-6	99218275L0	BASF

Propilenoglicol	Vaselina	57-55-6	30842	Palmar
Metilparabeno	Nipagin	99-76-3	70360	Dinâmica
Propilparabeno	Nipazol	94-13-3	65398	Dinâmica
Álcool Etílico	Etanol	64-17-5	SHBB6365 V	Sigma-Alderich

Uma formulação para administração sistêmica foi preparada e a partir disso, foi realizada diluição da formulação na proporção de 1:10 em solução fisiológica de cloreto sódio a 0,9% no momento da aplicação no animal. A formulação pronta para uso foi armazenada em frasco estéril na geladeira até sua utilização.

A fórmula utilizada para preparação da formulação de 17-AAG para tratamento sistêmico está descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Fórmula utilizada na produção da formulação de 17-AAG para tratamento sistêmico

Reagente	Quantidade utilizada
17-AAG	0,1 g
Kolliphor EL (Cremophor)	2,1 g
Propilenoglicol	3,0 g
Metilparabeno	0,002 g
Propilparabeno	0,0002 g
Álcool Etílico q.s.p	4,9 ml

A formulação foi produzida em duas fases, uma oleosa e outra aquosa. Inicialmente a fase oleosa foi preparada com propilparabeno, etanol e Cremophor e 17-AAG, e a fase aquosa com metilparabeno e propilenoglicol. Essas fases foram misturadas sob agitação constante (Figura 2). Em seguida, o pH foi medido e corrigido para $7,4 \pm 0,1$, quando necessário. A formulação foi filtrada em filtro de seringa de 0,22 μm , e foi estocada em frasco estéril armazenado a 4°C até sua utilização. Uma formulação placebo foi preparada da mesma forma (Figura 2), porém sem adição do 17-AAG.

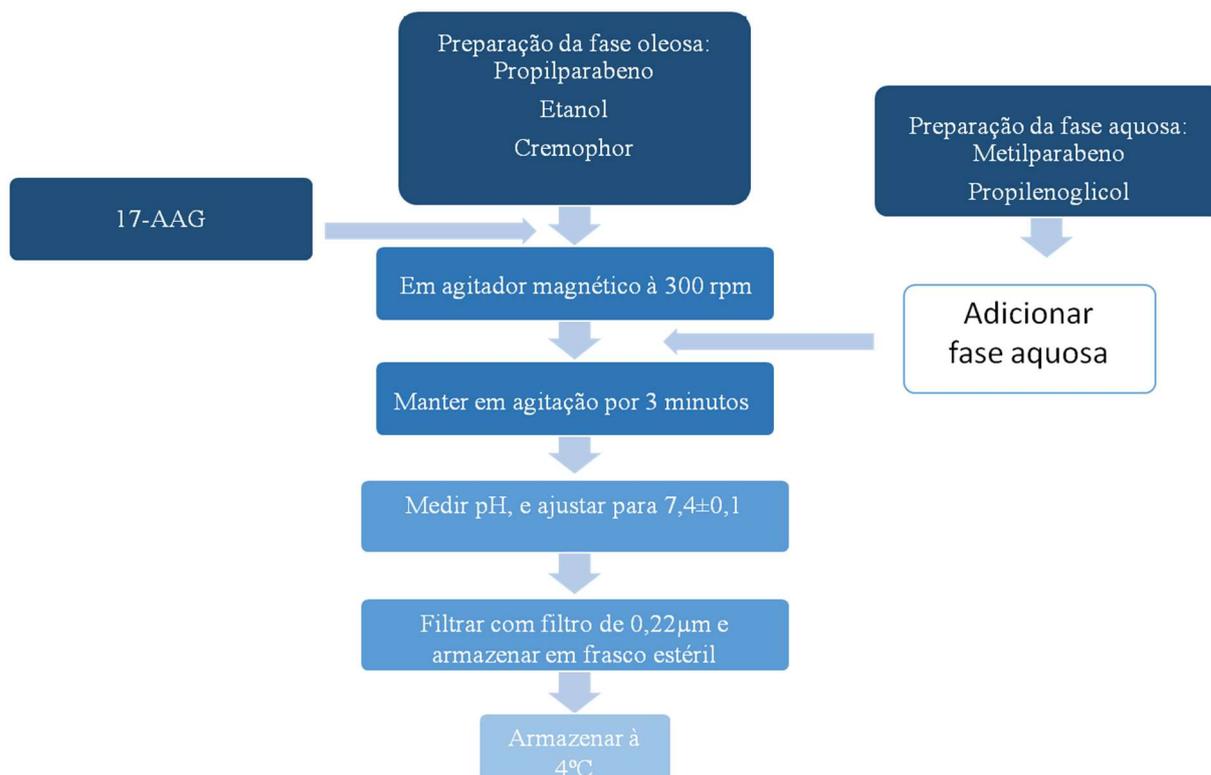


Figura 2 - Preparo da formulação de 17-AAG para administração sistêmica

4.2 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

4.2.1 Desenho Experimental

O projeto foi executado em dois experimentos realizados em cães saudáveis:

- Estudo I - Única administração com escalonamento de doses
- Estudo II - Múltiplas administrações na dose de 150 mg/m²

No estudo I foi realizado o tratamento com 17-AAG em quatro cães saudáveis para avaliação de toxicidade. Foi realizado um desenho de escalonamento de doses em 6 etapas, onde cada animal recebeu uma única dose de um dos tratamentos: Placebo, 50mg/m², 100mg/m², 150mg/m², 200mg/m² e 250mg/m², em cada etapa e na etapa seguinte recebeu outra dose (Figura 3). Foi utilizada a tabela de relação entre o peso corpóreo (Kg) e superfície corpórea em cães para o cálculo da administração do 17-AAG (Rodaski, Nardi 2008) (Figura 4). Foram realizados períodos de “wash-out” para cada animal, entre cada um dos tratamentos com cada dose, sendo cada período de 7 a 10 dias. Avaliações da toxicidade foram realizadas com exame clínico e coletas de sangue para avaliação laboratorial depois de cada tratamento por um período de 10 dias após o tratamento. Antes da aplicação do 17-AAG o animal foi

avaliado clinicamente e foi colhida amostra sanguínea para avaliação hematológica e bioquímica sérica. Após a finalização da administração do 17-AAG foram coletadas amostras sanguíneas para quantificação plasmática do fármaco nos tempos de 5min, 10min, 15min, 30min, 45min, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 32h. Nos dias 2, 4, 7 e 10 após a administração do 17-AAG foram feitas coletas sanguíneas para avaliações hematológicas e bioquímicas séricas.

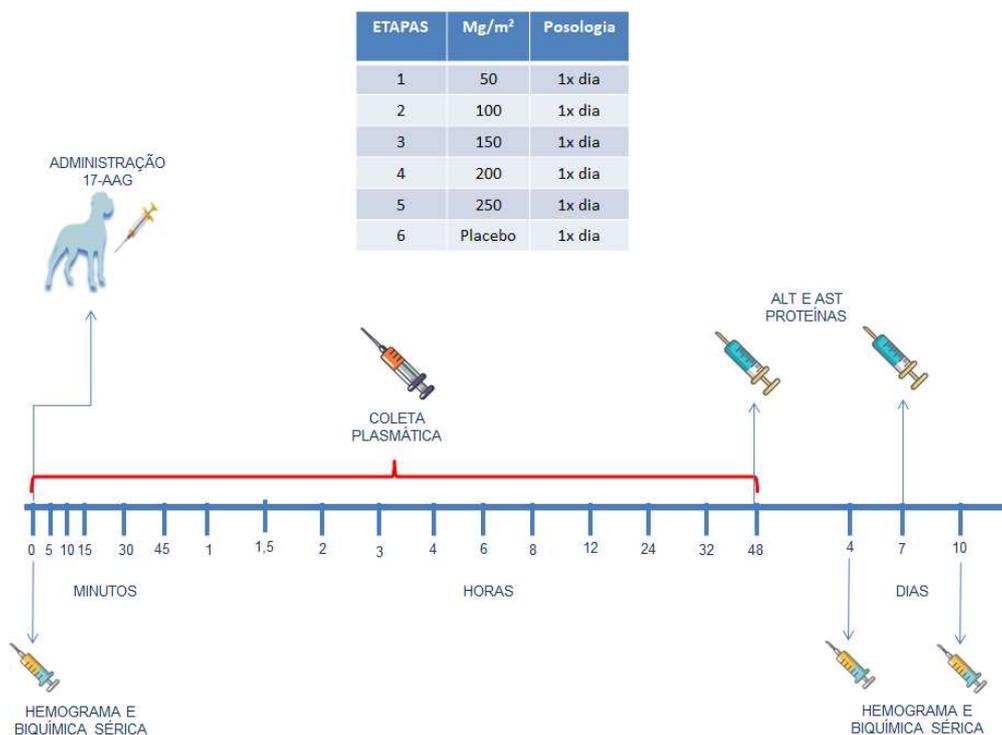


Figura 3 – Esquema de administração de doses de 17-AAG com escalonamento em cães saudáveis e avaliações realizadas nestes animais em cada etapa (Estudo I).

kg	m ²	kg	m ²	kg	m ²	kg	m ²	kg	m ²	kg	m ²
0,5	0,06	11	0,49	22	0,78	33	1,03	44	1,25	60	1,55
1	0,10	12	0,52	23	0,81	34	1,05	45	1,26	62	1,58
2	0,15	13	0,55	24	0,83	35	1,07	46	1,28	64	1,62
3	0,20	14	0,58	25	0,85	36	1,09	47	1,30	66	1,65
4	0,25	15	0,60	26	0,88	37	1,11	48	1,32	68	1,68
5	0,29	16	0,63	27	0,90	38	1,13	49	1,34	70	1,72
6	0,33	17	0,66	28	0,92	39	1,15	50	1,36	72	1,75
7	0,36	18	0,69	29	0,94	40	1,17	52	1,41	74	1,78
8	0,40	19	0,71	30	0,96	41	1,19	54	1,44	76	1,81
9	0,43	20	0,74	31	0,99	42	1,21	56	1,48	78	1,84
10	0,46	21	0,76	32	1,01	43	1,23	58	1,51	80	1,88

Figura 4 – Relação entre o peso e superfície em cães. Fonte: RODASKI, NARDI, 2008.

No estudo II foram utilizados nove animais saudáveis e em cada animal foram implantadas três caixas tissulares no subcutâneo entre as escápulas para avaliação da concentração de 17-AAG no líquido intersticial subcutâneo. Os 4 animais que participaram do estudo I, participaram do estudo II, sendo incluídos no estudo II após decorrido o tempo de “wash-out” e quando apresentaram os exames laboratoriais normais novamente. A inserção cirúrgica para implantação da caixa tissular foi realizada sob sedação (xilazina e quetamina) e anestesia de infiltração local (lidocaína). Após 12 dias do implante, cada animal recebeu três doses de 150mg/m² de 17-AAG com intervalo de 48h entre as doses (Figura 5). Avaliações da toxicidade foram realizadas com exame clínico e coletas de sangue para avaliação laboratorial após cada tratamento. Estas coletas e avaliações foram realizadas diariamente até um período de 04 dias após a primeira dose. Em seguida, os animais foram eutanasiados com coleta de amostras de tecidos para avaliação histopatológica.

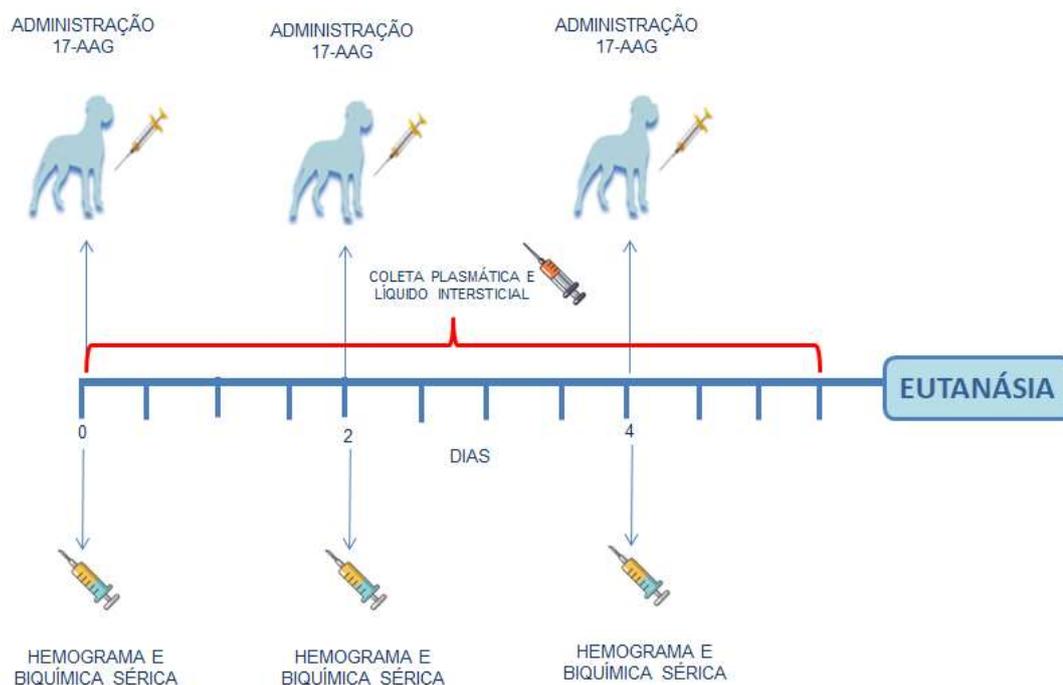


Figura 5 – Esquema de administração de múltiplas doses de 17-AAG em cães saudáveis e avaliações posteriores ao tratamento (Estudo II).

4.2.2 Bem-Estar Animal

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de modo a maximizar o conforto e minimizar a tensão, pânico, desconforto e dor dos mesmos.

Para realizar as observações e medições, ou para a coleta de amostras de sangue, foi feita a manipulação dos animais com a maior tranquilidade possível, evitando reações bruscas desnecessárias. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do IGM - FIOCRUZ (Certificado 011-2015/024-2017).

4.2.3 Animais incluídos no estudo

Para os estudos I e II foram selecionados 09 cães de ambos os sexos, sem raça definida, oriundos do canil do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA. Todos os animais foram identificados pelo nome e registro fotográfico que ficaram disponíveis na porta de cada baia durante o estudo experimental.

4.2.3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos cães no estudo

Uma seleção de animais candidatos a participar do estudo foi realizada dentre os cães no canil do IGM. Os critérios de inclusão foram: idade acima de 7 meses, animal clinicamente saudável e sem histórico de tratamentos farmacológicos nos últimos 15 dias. Foram considerados como critérios de exclusão: animais não aptos na avaliação clínica individual e/ou nos exames laboratoriais e animal agressivo.

Para realizar a seleção dos animais a serem incluídos no projeto, todos os animais elegíveis foram submetidos a avaliação clínica individual, coleta de amostras para análises hematológicas e bioquímicas e punção esplênica para avaliação de carga parasitária da infecção por *L. infantum* pela técnica da qPCR. Após a obtenção dos resultados da avaliação clínica e análises laboratoriais, todos os animais foram incluídos no estudo, sendo utilizados quatro dos nove no Estudo I e os nove no Estudo II.

4.2.4 Manejo

Os animais que participaram do estudo I e II por serem provenientes do canil já estavam adaptados ao local, as instalações e condições ambientais. Todas as tarefas relacionadas com os experimentos, que envolveram os animais, foram realizadas dentro do canil de experimentação, a fim de reduzir o estresse consequente da transferência dos animais experimentais. A lotação foi de 01 animal/baia. O canil é do tipo aberto com renovação de ar natural, sendo as baias teladas, os animais tinham

rotina de recreação em determinados horários do dia. Os animais foram alimentados com ração super Premium e água livre.

4.2.5 Administração do 17- AAG

A formulação administrada foi elaborada segundo a fórmula descrita por Burris et al. (2011), utilizando os reagentes descritos na Tabela 2. A administração foi realizada pela via intravenosa e o fármaco foi diluído em solução de dextrose, sendo o 17-AAG administrado nos cães pela via intravenosa em diferentes concentrações dependendo do estudo, com auxílio de bomba de infusão e seringa de 60 ml na velocidade de 60 ml/h.

O protocolo de administração do 17-AAG no estudo I foi baseado em um escalonamento de doses, onde cada animal foi submetido a 6 etapas. Estas etapas foram intervaladas com um período de “wash out” (descanso) de 7 a 10 dias. Nesse período de descanso o animal foi submetido a exames laboratoriais e observações clínicas diárias para avaliar a tolerabilidade, toxicidade e farmacocinética (Figura 3).

O protocolo de administração do 17-AAG no estudo II foi baseado em múltiplas administrações na dose de 150 mg/m², com intervalo de 48 horas entre elas, sendo um total de 3 administrações por animal. Os animais foram monitorados durante todo protocolo através de exames laboratoriais e observações clínicas diárias para avaliar a tolerabilidade, toxicidade e farmacocinética (Figura 5).

4.2.6 Avaliação da Segurança e Toxicidade nos Estudos I e II

As avaliações de toxicidade foram conduzidas no início, durante e após os estudos I e II. A avaliação da toxicidade foi realizada mediante avaliações clínicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas. Os animais foram acompanhados diariamente, através de avaliação clínica individual, até um período de 10 dias (estudo I) e 04 dias (estudo II) após o fim do protocolo de administração do medicamento. A avaliação clínica individual consistiu em dois tipos: avaliação clínica geral e avaliação clínica detalhada. Na avaliação clínica geral realizada diariamente, foi observada a atitude do animal (se estava alerta, prostrado, deprimido, apático, agressivo), a ingestão de água e alimentos, avaliação das fezes e urina e a presença de vômito. Na avaliação clínica detalhada realizada a cada 2 dias, os parâmetros avaliados foram temperatura corporal (°C – com termômetro retal), frequência cardíaca (batimentos/minuto), frequência respiratória (ciclos/minuto), mucosas externas

(conjuntiva e/ou oral), hidratação (elasticidade da pele), linfonodos superficiais (submandibular e poplíteo), consistência das fezes, presença de lesões ou secreções nos olhos, presença de secreção nasal (quantidade e tipo), estado da pelagem, presença de lesões e ectoparasitas na pele, atitude, presença de claudicação, coordenação e equilíbrio do animal.

No estudo I, foram realizadas coletas de sangue para análises hematológicas e bioquímicas antes do tratamento e 2, 4, 7 e 10 dias após o tratamento. No estudo II as coletas foram feitas antes, e com 2 e 4 dias após a primeira dose de 17-AAG. Os parâmetros hematológicos avaliados foram eritrograma e leucograma. Os dados bioquímicos avaliados foram dosagem de proteínas totais, albuminas, globulinas, relação A/G, colesterol total, bilirrubina, perfil renal (ureia e creatinina) e perfil enzimático hepático (ALT, AST, FA, GGT). Após a última aplicação do 17-AAG no dia 4, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de tecidos (pulmão, coração, rim, fígado, baço, intestino delgado e grosso) para análise histopatológica.

4.2.7 Avaliação da Farmacocinética nos estudos I, II

4.2.7.1 Coleta de amostras de sangue

Nos estudos I e II, um cateter intravenoso foi implantado na veia cefálica do membro anterior direito e esquerdo de cada animal. As coletas de amostras de sangue em tubos com EDTA foram feitas a cada 5 minutos antes da administração do 17-AAG e em diferentes tempos após a administração do 17-AAG:

Estudo I: 5min, 10min, 15min, 30min, 45min, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 32h após a administração do 17-AAG

Estudo II: 5m, 30m, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h após a administração do 17-AAG. Após a terceira aplicação do 17-AAG os animais foram eutanasiados após 6h, 8h e 12h.

Em ambos os estudos as amostras de sangue foram centrifugadas a 6000 rpm a 4°C durante 10 minutos. A fração que contém o plasma foi estocada a -20° C até o momento em que as concentrações plasmáticas de 17-AAG foram determinadas.

4.2.7.2 Coleta de líquido intersticial subcutâneo

Para coleta de líquido intersticial subcutâneo foram implantadas caixas tissulares nos animais que participaram do estudo II. As caixas tissulares foram

preparadas a partir de tubos PVC atóxico, siliconizado, flexível, não irritante. As dimensões da caixa foram de 3,5 cm de comprimento, 3 mm de diâmetro interno e 5 mm de diâmetro externo. A técnica foi baseada em STEGEMANN et al. (2006).

Três caixas autoclavadas foram implantadas subcutaneamente entre as escápulas de cada animal. A inserção cirúrgica foi realizada sob sedação (xilazina) e anestesia de infiltração local (lidocaína 2% e epinefrina 0,002%). Antes e após o procedimento cirúrgico foi administrado antibiótico (enrofloxacina – 5mg/kg) e anti-inflamatório (cetoprofeno 1% – 1mL/kg). A recuperação da cirurgia foi de 10 dias para permitir a cicatrização e o crescimento do tecido de granulação nas caixas. A coleta das amostras das caixas tissulares foi feita através de punção percutânea com agulha 21G e seringa de 20mL.

As amostras de líquido intersticial subcutâneo coletadas das caixas tissulares foram centrifugadas em uma microcentrífuga a 13.500 rpm por 10min e foram estocadas a -20°C até o momento em que as concentrações de 17-AAG foram determinadas.

4.2.7.3 *Determinação de 17-AAG por HPLC*

As amostras de plasma coletadas nos estudos I e II e de líquido intersticial subcutâneo obtido das caixas tissulares no estudo II foram analisadas, para determinação das concentrações de 17-AAG, no laboratório do Senai-Cimatec em Salvador/BA. Foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE - DAD) da marca Shimadzu com uma coluna de C18 de 3 µm, 15cm x 4.6 mm da marca Supelco.

A fase móvel utilizada foi de acetonitrila e água com 1% de ácido acético. Os volumes de injeção foram de 10µl e 50µl. A aquisição e o processamento dos dados foram realizados utilizando o software LabSolutions fornecido com o instrumento.

A técnica foi baseada nos métodos descritos por Agnew et al. (2001) e Johnston et al. (2008). Após descongelar alíquotas de 200µl de plasma ou 100µl de líquido intersticial subcutâneo das caixas tissulares a temperatura ambiente, estas amostras foram colocadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL. Subsequentemente, 600µl e 350µl de acetonitrila (ACN) foram adicionados a todas as amostras de plasma e de líquido intersticial subcutâneo, respectivamente. A mistura foi agitada em vórtex durante 30 segundos e as amostras foram centrifugadas por 13.500 rpm por 10

minutos. Após a centrifugação, 550ul do sobrenadante referente ao plasma e 350ul referente ao líquido intersticial subcutâneo foram pipetados em um novo frasco. Para validação da técnica, o 17-AAG diluído em série foi adicionado em plasma de animal não incluído no estudo (branco), que funcionou como a solução padrão. As concentrações do padrão de 17-AAG foram de 0,012 μ g a 10 μ g/ml. Foram validadas duas curvas calibradas com diferentes métodos, uma curva de 12ng a 0,125 μ g a 10 μ g/ml com injeção de 10 μ l. Os parâmetros de validação determinados foram linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, limite de quantificação e limite de detecção.

4.3.8 Análise de dados

Os parâmetros farmacocinéticos do 17-AAG foram obtidos a partir de concentrações plasmáticas individuais e foram avaliados a área embaixo da curva da concentração plasmática em função do tempo (AUC), concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tempo de meia vida ($t_{1/2}$), volume de distribuição e depuração (“clearance”). Os dados foram analisados no programa do Excel e WinNonlin em um modelo mono-compartimental.

5. RESULTADOS

A formulação sistêmica com 17-AAG produzida apresentou coloração roxa, opaca e sem presença de corpos particulados em suspensão ou precipitados. A formulação placebo era transparente e translúcida, e da mesma forma não apresentou partículas em suspensão ou precipitadas, e não possuía o fármaco 17-AAG (Figura 6).



FIGURA 6- Formulações sistêmicas preparadas para uso intravenoso: A) 17-AAG a 1% e B) Placebo

5.1 RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO I COM ADMINISTRAÇÃO ÚNICA DE 17-AAG INTRAVENOSA EM ESCALONAMENTO DE DOSES

5.1.1 Análise farmacocinética de 17-AAG no plasma

A curva de farmacocinética foi determinada para todos os animais. Os parâmetros farmacocinéticos após a administração das doses únicas de 50, 100, 150, 200 e 250mg/m² estão resumidos na tabela 3. A concentração máxima (C_{máx}) e a área sob a curva em função do tempo (AUCs) aumentaram proporcionalmente com o aumento da concentração de 17-AAG administrado (Figura 6). As AUCs da concentração plasmática em função do tempo apresentaram correlação linear somente entre as doses de 50 a 200mg/m² (R² = 0,9384), o que pode indicar a saturação do sistema metabólico ou da união do 17-AAG com proteínas plasmáticas nas doses maiores que 200mg/m² (Figura 6A). Não foi observada correlação entre o aumento da dose e o tempo de meia vida (t_{1/2}), permanecendo estes valores constantes (variando de 0,536 a 0,67 h), sugerindo um t_{1/2} curto. A média do t_{1/2} foi de 0,59 ± 0,05 com um coeficiente de variação (CV) de 8%. A depuração de 17-AAG foi em média de 0,026 ± 0,010 L/h/m² com um CV de 36%, porém os valores de coeficiente de variação entre os animais foram de 1% a 20%.

Tabela 3 - Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG em cães após administração endovenosa de diferentes concentrações deste em cães

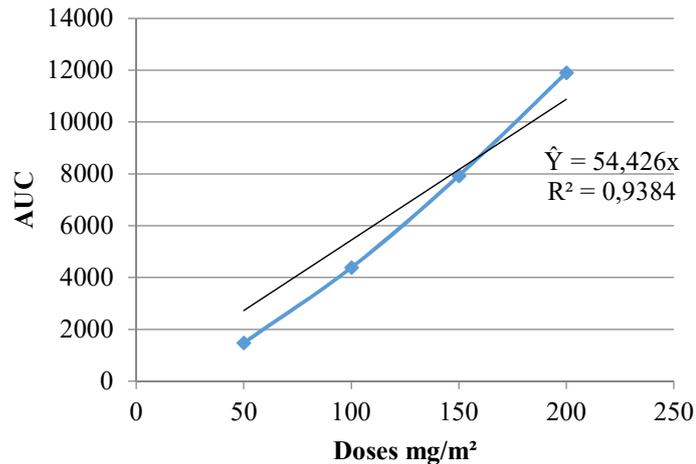
DOSE	AUC (ng*h/mL)	C _{máx} (ng/mL)	T _{1/2} (h)	Depuração (L/m ² /h)	VD (L/m ²)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
50 mg/m ²	1483,26 ± 694,52	1405,97 ± 686,71	0,54 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02
100 mg/m ²	4380,35 ± 1626,22	3756,41 ± 1422,52	0,61 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
150 mg/m ²	7927,84 ± 1548,51	6938,99 ± 1342,39	0,59 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
200 mg/m ²	11 902,75 ± 1962,12	9439,70 ± 991,11	0,67 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
250 mg/m ²	9632,29 ± 2667,12	8611,51 ± 1062,88	0,57 ± 0,21	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00

AUC= área sob a curva em função do tempo; C_{máx}= Concentração máxima; T_{1/2}= Tempo de meia vida; VD= volume de distribuição

A concentração da dose de 17-AAG administrada aos animais demonstrou ser proporcional à área embaixo da curva da concentração plasmática de 17-AAG em

função do tempo entre as doses de 50mg/m² e 200mg/m² (Figura 7A). A perda da linearidade após a dose de 200mg/m² (Figura 7B) pode estar indicando a saturação dos sistemas metabólicos, os processos distributivos e/ou processos de excreção do fármaco. Para a determinação de esquemas de múltiplas administrações é necessário avaliar o possível acúmulo do fármaco.

A



B

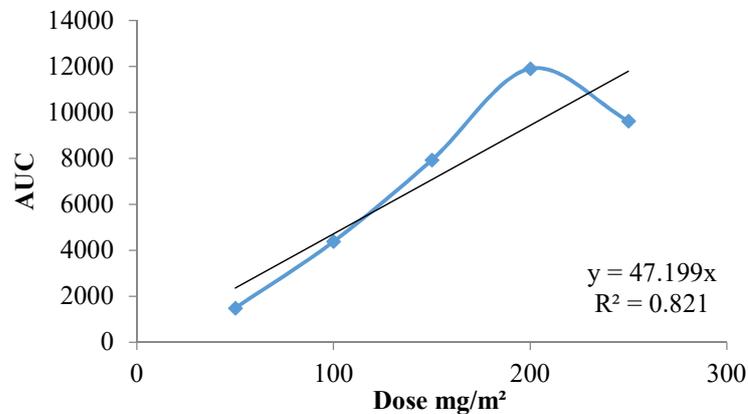


Figura 7 - Proporcionalidade entre a doses de 17-AAG e a AUC plasmática após a administração endovenosa em cães. A - Doses de 50 a 200mg/m²; B – de Doses 50 a 250mg/m²

No presente estudo, foi constatado um rápido declínio do 17-AAG plasmático (FIGURA 8), sendo possível observar que a concentração plasmática foi diretamente proporcional à dose aplicada.

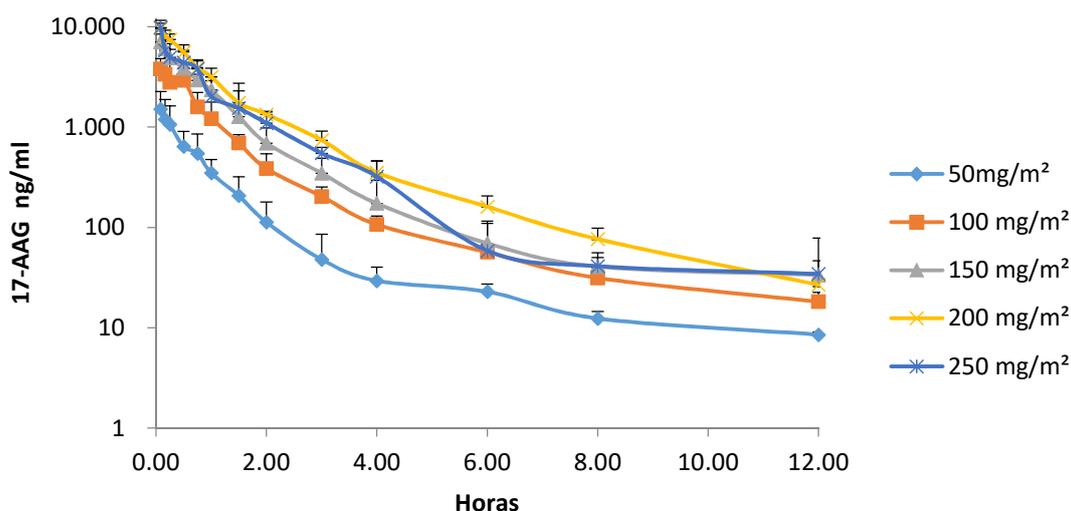


Figura 8 – Distribuição da concentração plasmática de 17-AAG avaliada até 12 horas após administração endovenosa, por infusão contínua em cães durante 30 minutos

5.1.2 Avaliação da toxicidade de 17-AAG por via intravenosa em única dose utilizando escalonamento de doses

Não foram observados efeitos adversos durante e após a administração intravenosa do placebo. O aparecimento dos efeitos adversos relacionados com o fármaco foi dependente da dose, e foi observado com maior frequência nas doses de 200 e 250mg/m² quando comparado com as doses mais baixas (Tabela 4). A administração de 17-AAG entre as doses de 50 a 150mg/m² foram consideradas seguras e associadas a mínima toxicidade.

No estudo I em 100% (4/4) dos animais foi observado náuseas durante a administração das doses de 200mg/m² e 250mg/m² de 17-AAG (Tabela 4). Após a administração foi notada diarreia com fezes pastosas em 25% dos animais nas doses de 150, 200 e 250mg/m²; diarreia sanguinolenta em 75% dos cães nas doses de 200mg/m² e 100% na dose de 250mg/m²; e vômito em 25% nas doses de 200 e 250mg/m². Outros efeitos secundários observados nos cães durante a administração do 17-AAG, no estudo I, foram pruridos, eritema e hipertermia.

Os resultados dos parâmetros hematológicos não revelaram nenhuma alteração associada ao tratamento intravenoso com o placebo e o 17-AAG. Em contrapartida, quando foi avaliada a bioquímica sérica foi constatada uma elevação reversível da enzima alanina aminotransferase (ALT) após a administração das doses de 100 (50%), 150 (75%), 200 (75%) e 250mg/m² (100%). A dosagem da enzima aspartato aminotransferase (AST) estava alterada nas doses de 100 (50%), 150

(50%), 200 (100%) e 250mg/m² (100%). Durante o período de wash-out, as concentrações de transaminases retornaram para os valores de normalidade presentes antes da administração da nova dose, não sendo observado potencial de hepatotoxicidade acumulativa. Em um dos animais após a administração da dose de 250mg/m², foi necessário o tratamento de suporte com fluidoterapia e antibioticoterapia preventiva, pois os animais apresentaram um quadro de gastroenterite intensa.

Tabela 4 - Efeitos adversos observados em cães saudáveis após administração de 17-AAG por via intravenosa em diferentes concentrações

Efeitos adversos	Número de animais avaliados (n=4)					
	Placebo	50mg/m ²	100mg/m ²	150mg/m ²	200mg/m ²	250mg/m ²
Bioquímica						
ALT	0	1 (25%)	2 (50%)	3 (75%)	3 (75%)	4 (100%)
AST	0	0	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)	4 (100%)
Gastrointestinal						
Diarreia						
sanguinolenta	0	0	0	0	3 (75%)	4 (100%)
Diarreia (fezes						
pastosas)	0	0	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)
Náusea	0	0	0	0	4 (100%)	4 (100%)
Vômito	0	0	0	0	1 (25%)	1 (25%)
Outros						
Hipertemia	0	0	0	1 (25%)	0	1 (25%)
Prurido	0	0	0	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
Eritema	0	0	0	1 (25%)	2 (50%)	4 (100%)

A avaliação da toxicidade possibilitou determinar que a administração de doses até 150mg/m² de 17-AAG por via intravenosa apresentou segurança toxicológica aceitável, podendo ser utilizada em estudos de múltiplas administrações a fim de avaliar a eficácia para o tratamento da LVC.

5.2 ESTUDO II- AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE DO 17-AAG EM CÃES SAUDÁVEIS APÓS ADMINISTRAÇÕES DE MÚLTIPLAS DOSES

5.2.1 Análise farmacocinética de 17-AAG no plasma e no líquido intersticial subcutâneo

As curvas de concentração do 17-AAG no plasma mostram que a concentração do fármaco caiu no plasma rapidamente e que o fármaco alcançou concentrações próximas a 100ng/ml no líquido subcutâneo durante todo o período do estudo (Figura 9 e Tabela 5). A rápida redução da concentração plasmática observada (Tabela 6), conjuntamente com a diminuição lenta da concentração no tecido subcutâneo indicam o alto grau de distribuição tecidual do 17-AAG.

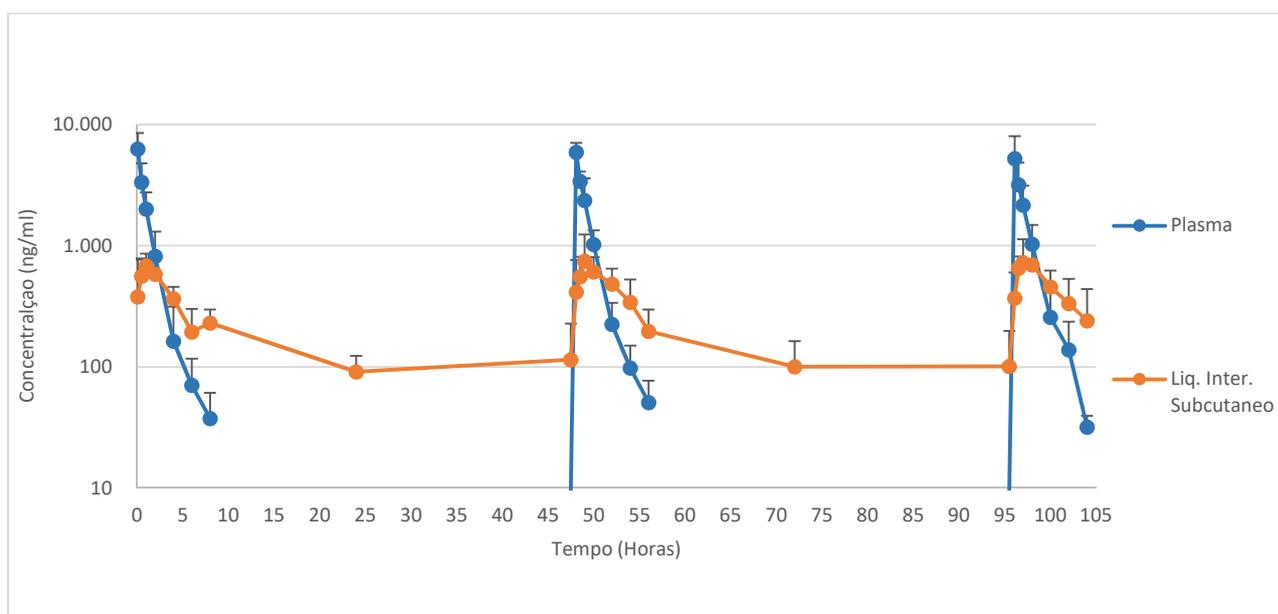


Figura 9 - Concentração de 17-AAG no plasma e no líquido subcutâneo em cães avaliada até 105 horas após administração endovenosa de múltiplas doses.

Os resultados descritos nas tabelas 5 e 6 mostram que não houve acúmulo de 17-AAG após múltiplas administrações de 150mg/m² com intervalos de 48 horas. Não ocorrendo alteração no tempo de meia vida, na concentração máxima e na área sob a curva em diferentes tempos no plasma ou no líquido intersticial após as três administrações de 150mg/m².

Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG no líquido intersticial subcutâneo após 3 administrações endovenosas em cães de 150mg/m² com intervalos de 48 horas.

Administração	T $\frac{1}{2}$ (h)	C _{máx} ($\mu\text{g/ml}$)		AUC ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)				
				0-4h	0-6h	0-8h	0-24h	0-47,5h
		Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Primeira	38 \pm 16	704 \pm 332	1820 \pm 430	2301 \pm 409	2659 \pm 437	4765 \pm 333	7382 \pm 1357	
Segunda	28 \pm 9	736 \pm 294	1943 \pm 618	2553 \pm 638	2913 \pm 686	4070 \pm 700	7054 \pm 2189	
Terceira	N/A	726 \pm 401	895 \pm 408	2040 \pm 1097	2734 \pm 1442	3505 \pm 2417	N/A	

AUC= área sob a curva em função do tempo; C_{máx}= Concentração máxima; T_{1/2}= Tempo de meia vida

Tabela 6- Parâmetros farmacocinéticos de 17-AAG no plasma após 3 administrações endovenosas em cães de 150mg/m² com intervalos de 48 horas.

Administração	T $\frac{1}{2}$ (h)	C _{máx} ($\mu\text{g/ml}$)	Depuração (L/m ² /h)	VD (L/m ²)	AUC ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) 0-8h
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Primeira	0,69 \pm 0,22	6309 \pm 2204	0,023 \pm 0,002	0,029 \pm 0,003	6353 \pm 432
Segunda	0,69 \pm 0,24	5912 \pm 1127	0,021 \pm 0,001	0,030 \pm 0,002	7054 \pm 382
Terceira	0,81 \pm 0,35	5254 \pm 2784	0,022 \pm 0,002	0,033 \pm 0,003	6850 69

AUC= área sob a curva em função do tempo; C_{máx}= Concentração máxima; T_{1/2}= Tempo de meia vida; VD= volume de distribuição

5.2.2 Avaliação da toxicidade de 17-AAG após administrações de doses múltiplas

Durante a administração da primeira e da terceira dose de 150mg/m² de 17-AAG, apenas 1 animal manifestou reação cutânea com pelos temporariamente eriçados (Tabela 7). No segundo dia, após a administração da segunda dose, 2 animais apresentaram fezes pastosas. No terceiro dia, 3 cães tiveram diarreia com fezes líquidas, 1 diarreia sanguinolenta e 2 apresentaram fezes pastosas. No quarto dia, 7 animais apresentaram fezes pastosas e 1 animal diarreia sanguinolenta.

Não foi encontrada nenhuma alteração laboratorial no hemograma dos animais após a administração do 17-AAG. Nas análises de bioquímica sérica foi notada elevação das enzimas ALT e AST em 33% dos cães (3/9) (Tabela 7). No quarto dia, apenas em 1 animal as transaminases permaneceram fora dos valores de normalidade. Em relação aos sinais clínicos concluímos que 1 animal apresentou reação cutânea, os 9 apresentaram fezes pastosas, com 4 apresentando diarreia e 3 apresentaram aumento de AST e ALT.

Tabela 7- Efeitos adversos apresentados após múltiplas administrações na dose de 150mg/m²

Efeitos adversos	Animais apresentando reações adversas n (%)
Bioquímica	
ALT	3 (33%)
AST	3 (33%)
Gastrointestinal	
Diarreia (fezes líquidas)	3 (33%)
Fezes pastosas	9 (100%)
Diarreia sanguinolenta	1 (11%)
Náusea	0
Vômito	0
Outros	
Hipertermia	0
Reação cutânea	1 (11%)
Eritema	0
Prurido	0

5.2.3 Histopatologia dos Tecidos dos Animais após o estudo II

Para avaliação histopatológica foram coletados os seguintes tecidos: rim, pulmão, fígado, baço, coração, intestino delgado e intestino grosso. Os nove animais que passaram pelo estudo I e II, após a finalização do estudo II foram eutanasiados, para avaliação dos tecidos e tentar correlacionar possíveis alterações nos órgãos com o efeito da farmacodinâmica do 17- AAG.

Foram encontradas alterações histopatológicas no rim, fígado, baço, intestino delgado e grosso. No pulmão e coração não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos animais.

No rim, em 100% (9/9) dos animais foi observada degeneração vacuolar do epitélio tubular renal (Figura 10); no fígado, em 100% (9/9) dos animais foi observada mobilização de células de Kupffer (Figura 11); no baço, em 100% (9/9) dos animais foi observada congestão, hiperplasia imunoblástica e desorganização do baço do tipo II e III (LIMA, et al. 2014) (Figura 12). No intestino delgado, em 22% (2/9) dos animais foram observados focos de calcificação da mucosa; no intestino grosso em 55% (5/9)

foi observada colite e em 11% (1/9) a presença de focos de calcificação da mucosa (Figura 13).

Tabela 8- Alterações histopatológicas em tecidos dos cães eutanasiados após múltiplas administrações do 17-AAG

Alterações histopatológicas mais frequentes	Animais apresentando alterações n (%)
Rim	
Degeneração vacuolar do epitélio tubular renal	9 (100%)
Fígado	
Mobilização de células de kupffer	9 (100%)
Baço	
Congestão	9 (100%)
Hiperplasia imunoblástica	9 (100%)
Desorganização do baço em tipo II/III	9 (100%)
Intestino Delgado	
Focos de calcificação da mucosa	2 (22%)
Intestino Grosso	
Focos de calcificação da mucosa	1 (11%)
Colite	5 (55%)

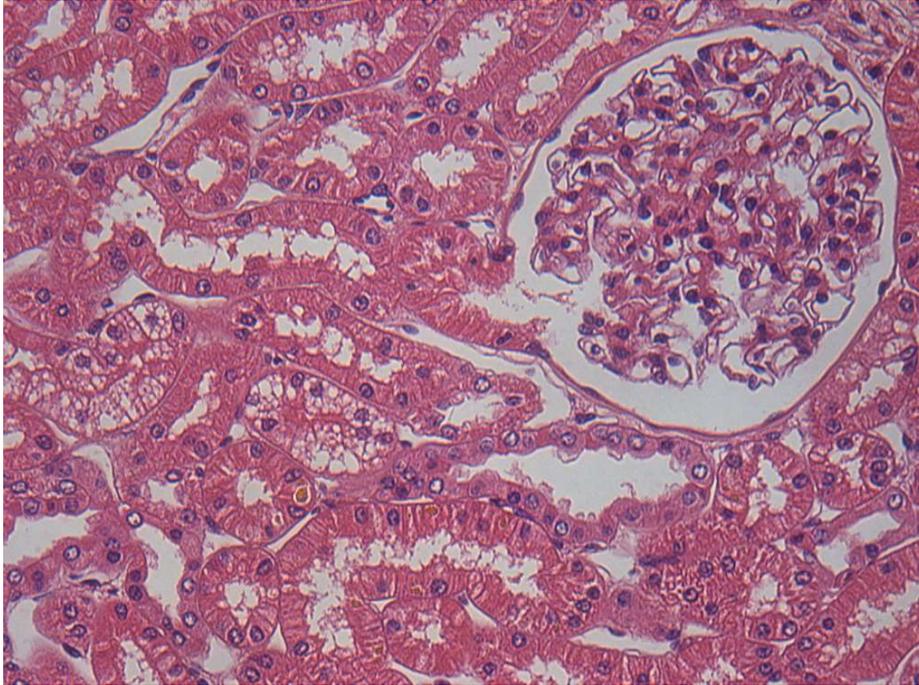


Figura 10 - Corte histológico do rim demonstrando degeneração vacuolar do epitélio tubular renal em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x).

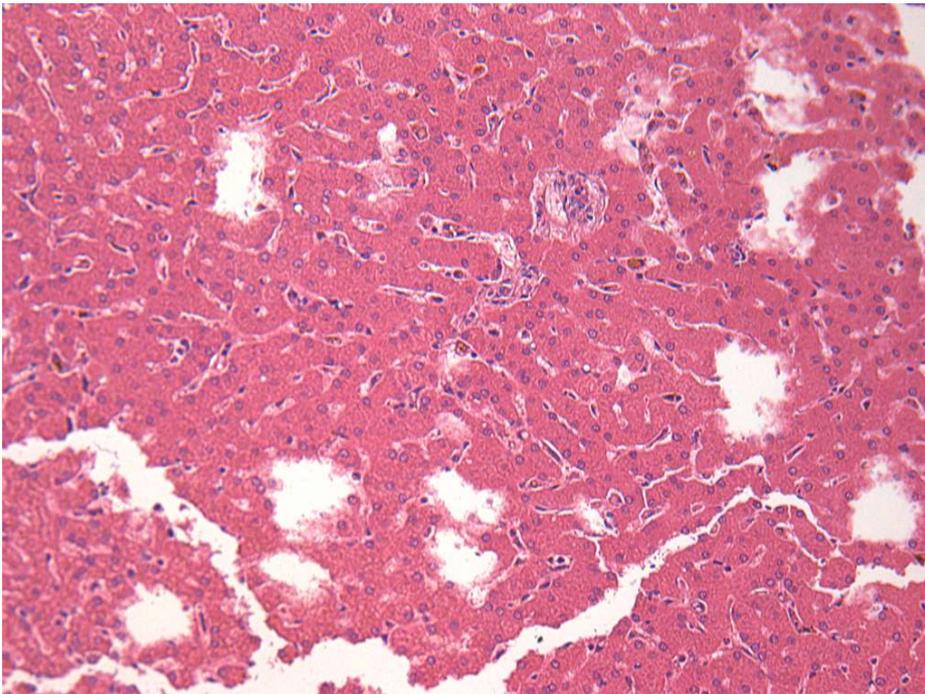


Figura 11 - Corte histológico do fígado demonstrando mobilização de célula de Kupffer em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x).

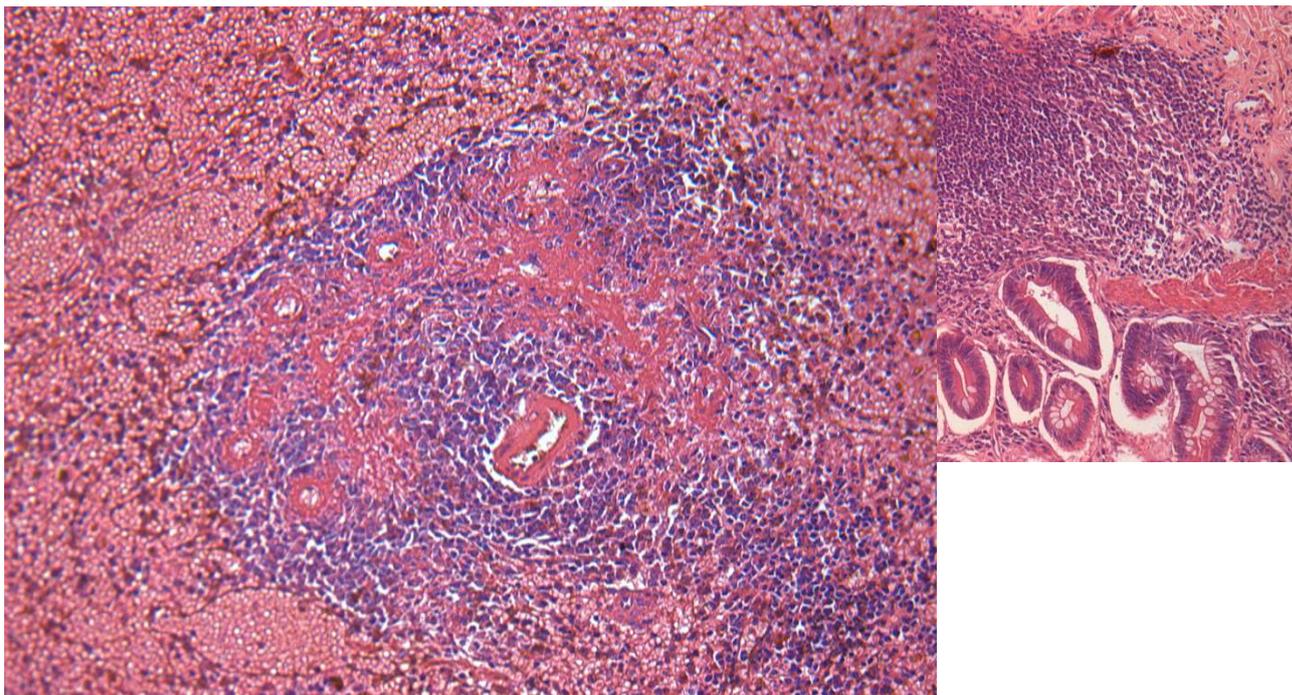
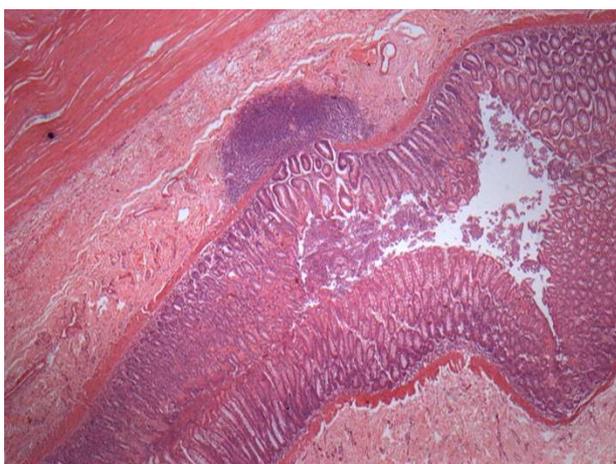


Figura 12 - Corte histológico do baço demonstrando hiperplasia plasmocitária e desorganização do baço tipo II/III em animal tratado com 17-AAG (aumento de 40x).



A

B

Figura 13 A e B- Cortes histológicos do intestino grosso demonstrando colite em animal tratado com 17-AAG (A- aumento de 4x/ B- aumento de 40x).

6. DISCUSSÃO

O 17-AAG para ser usado no tratamento da LVC precisa passar por fases de avaliação de farmacocinética e segurança, como foi realizado nesse estudo, para depois ser realizada avaliação de sua eficácia no tratamento de cães doentes.

Em relação a farmacocinética do 17-AAG administrado em cães, foi observado um pico plasmático nos primeiros minutos após a administração, com queda rápida

da concentração em até 10 horas, assim como foi descrito por Egorin et al. (2001) em roedores. Além do declínio rápido do 17-AAG plasmático, houve diminuição lenta da concentração do composto no tecido subcutâneo, indicando um alto grau de distribuição tecidual do 17-AAG. Corroborando os nossos achados, Egorin et al. (2001) observaram uma ampla distribuição do 17-AAG pelos tecidos com rápido decaimento da concentração plasmática, além da sua presença em todos os tecidos por até 6 a 8 horas após sua administração, com maior persistência nos pulmões, baço e fígado. Esses dados demonstram que a maioria dos tecidos em camundongos é exposta ao 17-AAG por um tempo mais prolongado do que no plasma, em decorrência de sua baixa hidrosolubilidade.

Houve proporcionalidade entre a concentração plasmática e a dose aplicada de 17-AAG até $200\text{mg}/\text{m}^2$, porém nas doses maiores houve perda da linearidade, o que pode estar relacionado a saturação dos sistemas metabólicos, os processos distributivos e/ou processos de excreção do fármaco. A correlação positiva entre a concentração plasmática máxima (C_{max}), a área sob a curva (AUC) e a dosagem de 17-AAG foi observada em diversos estudos realizados em roedores, cães e humanos (EGORIN et al., 2001, RAMANATHAN et al., 2005, RICHARDSON et al., 2010, IYER et al., 2012, TALAEI et al., 2018).

A ocorrência de efeitos adversos relacionados com a administração do 17-AAG foi dependente da dose, havendo mínima toxicidade quando aplicamos nos cães doses de 50 a $150\text{mg}/\text{m}^2$, que, portanto, consideramos como seguras para uso nesses animais. Os efeitos adversos observados foram náuseas, diarreia, vômito, prurido, eritema e hipertermia nas doses a partir de $100\text{mg}/\text{m}^2$. Também foi observada elevação reversível das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) após a administração das doses acima de $100\text{mg}/\text{m}^2$, não sendo observado potencial de hepatotoxicidade acumulativa. A elevação das enzimas ALT e AST nos cães teve caráter transitório e estas voltaram à normalidade nos intervalos de washout. Em estudos anteriores, a hepatotoxicidade foi o principal efeito da administração de 17-AAG em humanos e cães com elevação das transaminases hepáticas e bilirrubina sérica (SAUSVILLE et al., 2003, GLAZE et al., 2005). Náusea e diarreia, além da elevação das enzimas ALT e AST também foram efeitos colaterais relatados em pacientes tratados com 17-AAG com doses variando de 150 a $340\text{mg}/\text{m}^2$ com diferentes esquemas de tratamento que variaram entre administração diária ou com intervalos de até 72 horas por Ramanathan et al. (2005), Gordon et al.

(2008), Richardson et al. (2010) e Saif et al (2013). Solit et al. (2007) também observaram os sinais relatados e hepatotoxicidade com diferentes doses e esquemas terapêuticos com 17-AAG em pacientes e sugeriram que o esquema de tratamento duas vezes na semana com intervalo entre os ciclos de tratamento poderia reduzir a hepatotoxicidade.

A partir desses achados que indicaram que a máxima dose tolerável em cães é de 150 mg/m², realizamos um segundo ensaio com múltiplas doses utilizando intervalo de 48 horas após o período de wash-out. As manifestações adversas (reação cutânea de hipersensibilidade e diarreia) observadas em cães que receberam dose única de 150 mg/m² de 17-AAG no primeiro ensaio, também foram observadas no segundo ensaio em cães. Alguns cães, também apresentaram elevação das enzimas ALT e AST. Não foi encontrada alteração no hemograma dos animais, diferentemente do observado em estudos realizados com humanos em que foram observadas alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia em tratamento de pacientes com doses de 17-AAG e esquemas de tratamento variados (RAMANATHAN et al., 2005, GORDON et al., 2008, RICHARDSON et al., 2010, SAIF et al, 2013),

As alterações de hipersensibilidade cutânea observadas em alguns animais podem ser em decorrência do uso do Cremophor, que foi utilizado como diluente do 17-AAG, apesar de que os animais do grupo placebo que receberam somente Cremophor não apresentaram reação cutânea, esta pode ser em decorrência da administração dos dois compostos em conjunto. Existem relatos de que este veículo foi capaz de induzir reações de hipersensibilidade e anafilaxia (HO et al, 2013). O 17-AAG não é um composto hidrossolúvel havendo necessidade de uso de veículos para compostos com baixa solubilidade em água para viabilizar sua utilização. Em muitos estudos foi utilizado o DMSO, porém este composto não foi utilizado neste estudo, devido a sua toxicidade com risco de causar irritação, inflamação e trombose vascular (HO et al, 2013). Para contornar o risco de hipersensibilidade ao Cremophor, é sugerida a administração de anti-histamínicos antes de sua utilização (MODI et al., 2007).

A avaliação da toxicidade possibilitou determinar que a administração de múltiplas doses de 150mg/m² de 17-AAG por via intravenosa apresentou segurança toxicológica aceitável. As alterações histopatológicas resultantes dessa administração foram detectadas principalmente no rim, fígado, baço, intestino delgado e grosso dos animais tratados, corroborando achados anteriores descritos em cães e roedores que

receberam 17-AAG por via intraperitoneal ou intravenosa (PAGE et al., 1997, NOKER et al, 1999, GLAZE et al., 2005)

Ramanathan et al. (2005) evidenciaram que a toxicidade hepática é dose limitante. No fígado foi observado em todos animais desse estudo a mobilização de células de Kupffer, que pode ocorrer em decorrência de que o 17-AAG requer extenso metabolismo hepático pelo citocromo P450 como relatado por Egorin et al. (2001). Dessa forma, o fígado torna-se um órgão alvo para lesões leves a moderadas, como descrito em modelo de ratos e cães tratados, concomitante ao aumento de AST, ALT, fosfatase alcalina e GGT no modelo canino (PAGE et al., 1997, NOKER et al, 1999). Amin et al. (2005) avaliaram a toxicidade do 17-AAG em fragmentos de tecido hepático de cães incubados em meio contendo concentrações que variaram entre 0.5 a 5 μm de 17-AAG, e observaram inibição da resposta proliferativa das células epiteliais biliares dependentes da concentração e do tempo, assim como alteração dos marcadores AST, ALT, ALP e GGT no tecido hepático de cães tratados com 17-AAG

Semelhante ao observado por Glaze et al. (2005), em todos animais desse do nosso estudo foi observada congestão e atrofia do tecido linfoide no baço, além da presença de lesões inflamatórias no intestino delgado e no intestino grosso dos cães. Apesar de ter sido relatado toxicidade renal em camundongos (PAGE et al., 1997), o nosso estudo foi o primeiro a observar a presença de degeneração vacuolar do epitélio tubular no rim de todos os animais tratados com 17-AAG na dose de 150 mg/m^2 .

Em resumo, nossos resultados mostram que o 17-AAG na dose de 150 mg/m^2 leva à toxicidade hepática moderada, dose-dependente e reversível, corroborando dados de ensaios clínicos realizados em humanos que mostram que o composto pode ser administrado com segurança (RICHARDSON et al., 2010, TALAEI et al., 2019). Para redução da toxicidade tem se avaliado a utilização do derivado do 17-AAG hidrossolúvel, o 17-DMAG. No entanto, em cães na dose de 16 mg/m^2 pela via intravenosa por dia sua utilização foi fatal. A utilização do 17-DMAG em uso diário na dose de 8 mg/m^2 por via intravenosa ou 16 mg/m^2 por via oral, esse análogo apresentou toxicidade em cães (GLAZE et al., 2005). Outra alternativa ao uso do 17-AAG livre, é carregá-lo em nanoformulações ou lipossomas que podem transportar o composto e liberá-lo de forma controlada, sobrepondo a limitação de sua baixa solubilidade, reduzindo sua toxicidade (TALAEI et al. 2018). Petersen et al. (2018)

produziram lipossomas contendo 17-AAG que apresentaram um aumento de 33 vezes na solubilidade da droga.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que o 17-AAG e seus análogos apresentam potencial para o tratamento da LVC, pois este causou baixa toxicidade na dose de 150 mg/m², mas que a hepatotoxicidade observada com o esquema de dosagem intervalado por 48 horas apesar de ser reversível aponta para esforços para redução da toxicidade como a utilização de nanoformulações ou lipossomas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S., THEODOR, O. Vectors of Mediterranean Kala Azar. **Nature**, v. 130, p. 507, 1932. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/130507a0>
- AGNEW, E. B. *et al.* Measurement of the novel antitumor agent 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 755, n. 1–2, p. 237–243, 2001.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, Pt 18, p. 2993–3002, set. 1999.
- ALVAR, J. *et al.* Canine Leishmaniasis. In: **Advances in Parasitology**. v. 57, p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n.1, p. 259-265, 2004.
- AMIN, K. *et al.* In vitro detection of differential and cell-specific hepatobiliary toxicity induced by geldanamycin and 17-allylamino-geldanamycin using dog liver slices. **Toxicological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 442–450, 2005.
- ANDRADE, H. M. *et al.* Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.
- ANSARI, N. A.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and IFN- γ receptor 1 are the major immunological determinants associated with post-kala azar dermal leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 7, p. 958–965, 2006.
- AZEVEDO, M. Á. A. DE *et al.* Avaliação da Leishmaniose Visceral Canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 123–127, 2008.
- BACA, Q. F.; GOLAN, D. E. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios da Farmacologia – A base fisiopatológica da farmacologia**. 3 ed. 2014. cap. 3, p. 95-131,
- BANETH, G. Disease risks for the. **In Practice**, v. 25, p. 272–277, abr. 2003.
- BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315–324, 2002.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREEN, C. E. (ed) **Doença infecciosa do cão e do gato**. Elsevier, St Louis, Missouri, 2006. p. 685-696.

BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195–197, 2004.

BENGTSSON B, LUTTMAN J, JACOBSSON SO. Evaluation of a tissue cage model for use in cattle. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 25, n. 4, p. 480-494, 1984.

BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001

BOARINO, A. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B Epitopes of *Leishmania infantum* for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** v. 12, n. 5, p. 647–653, 2005.

BORJA, L. S. *et al.* Correction: High accuracy of an elisa test based in a flagella antigen of *Leishmania* in serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis with potential to improve the control measures in Brazil—A phase II study (PLoS Negl Trop Dis, (2018) 12, 10, 10.1371/journal.pntd.0006871). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1, 2018.

BORJA, L. S. *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. **Registro do produto de uso veterinário denominado Milteforan 2% Solução Oral para cães**. Nota técnica conjunta nº001/2016- MAPA/MS, de 17 de agosto de 2016. Disponível em <
<http://www.sbmt.org.br/portal/wpcontent/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília, DF, 2006. 120p.

BRASIL, M. S. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde. 1 ed., p. 29, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008. **Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Bib. Virtual Saúde, 2008.

BURATTINI, M. *et al.* Modelling of the dynamics of leishmaniasis considering human, animal host and vector populations. **Math Modern Analytical Scientific Comp**. v. 26, p. 1-16, 1995.

BURRIS, H. A. *et al.* Tanespimycin pharmacokinetics: A randomized dose-escalation crossover phase 1 study of two formulations. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1045–1054, 2011.

BUXTON, I. L.O.; BENET, L. Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação, e eliminação dos fármacos. In: BRUTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. São Paulo, 2012. cap. 2, p. 17-40.

CALVO, M. V., et al. Farmacocinética clínica. **Farmacia Hospitalaria**, v. 1, p. 625-665, 2002.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, 2006.

CARDOSO L, CABRAL M. Leishmania e Leishmaniose Canina. **Revista Port Ciencia Veterinária**, v. 13, p. 121-141, 1999.

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

CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 22 nov. 1997.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358–369, 2003.

CLARKE, C. R. Tissue-chamber modelling systems*/applications inveterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 12, p. 349-368, 1989.

COSTA, A. *et al.* Desarrollo de PCR multiplex para detección y diferenciación de categorías de *Escherichia coli* diarreogénicos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 1, p. 25–33, 2014.

COSTA, C. H. N. Quanto é efetivo o abate de cães para o controle do calazar zoonótico? Uma avaliação crítica da ciência, política e ética por trás desta política de saúde pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232–242, 2011.

DA COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

DANSIRIKUL, C.; CHOI, M.; B. DUFFULL, S. Estimation of pharmacokinetic parameters from non-compartmental variables using Microsoft Excel. **Computer in Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 389-403, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DENNY, K.H., STEWART, C. W. Acute, Sub-acute, sub-chronic and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. In: FAQI, A, S. **A Comprehensive e guide to toxicology in preclinical drug development**. 1^a ed. Amsterdam. Editora Elsevier, 2013. p. 87-104.

DE QUEIROZ, N. M. G. P. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34–40, 2010.

DE VRIES, P. J. *et al.* Quantification of the response to miltefosine treatment for visceral leishmaniasis by QT-NASBA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 12, p. 1183–1186, 2006.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 341–352, 1999.

DIAS, Álvaro Felipe de Lima Ruy *et al.* Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, p. 107947, 2020.

DIETZE, Reynaldo. **Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas**. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la Salud, 2005. p. 63-65.

DORLO, T. P. C. *et al.* Pharmacokinetics of miltefosine in old world cutaneous leishmaniasis patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2855–2860, 2008.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–30, ago. 1996.

EGORIN, M. J. *et al.* Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 330507) in CD2F1 mice¹. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 291–302, 2001.

ERLICHMAN, C. Tanespimycin: The opportunities and challenges of targeting heat shock protein 90. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 6, p. 861–868, 2009.

EVANS, G. **A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v.87, n.1, p. 93-120, 2014

FAYET, G. Canine leishmaniasis in Europe; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, Meril Biological Technical Bulletin, 1999.

FERROGLIO, E. *et al.* Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 7, p. 636–641, 2006.

FOGLIA MANZILLO, V. *et al.* Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2013.

FOLGUEIRA, C. *et al.* Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 369–377, 2007.

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 359–377, 2007.

FOSTER, D. M.; VICINI, P. Chapter 8 – Non-compartmental and compartmental approaches to pharmacokinetic data analysis. In: ATKINSON, A. J. *et al.* (Ed.). **Principles of Clinical Pharmacology**. 3rd. Academic Press, 2012.

FRAGA, D. B. M. *et al.* The Rapid test based on *leishmania infantum* chimeric rk28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2016.

FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 3–4, p. 213–220, ago. 2005.

GAMA, M. E. A. *et al.* Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 889–893, 2004.

GLAZE, E. R. *et al.* Preclinical toxicity of a geldanamycin analog, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in rats and dogs: Potential clinical relevance. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 637–647, 2005.

GOMES, A. H. S. *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3–4, p. 234–241, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

Gough, K. *et al.* Assessment of dose proportionality: Report from the statisticians in the pharmaceutical industry/pharmacokinetics UK joint working party. **Drug Info. J.** 29:1039–1048, 1995.

GREKO, C. **Tissue Cages in Calves for Studies on Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Relationships of Antimicrobials.** Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Veterinaria, [Doctoral thesis], 61 p, 2003.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat.** 3th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 1376 p., 2011.

GRIMALDI, G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.

GUARGA, J. L. *et al.* Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Tropica**, v. 77, n. 2, p. 203–207, 2000.

LEISHVET, 2018. Disponível em: <http://www.leishvet.org/2018/08/20/10th-anniversary/>).

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, p. 151–162,(2005). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>

LIMA, Isadora S. *et al.* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.

HAMERLINCK, F. F. V. *et al.* Serum neopterin concentrations during treatment of leishmaniasis: Useful as test of cure? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 31–34, 2000.

HO, S. W. *et al.* Effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) in transgenic mouse models of frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. **Translational Neurodegeneration**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2013.

HOLDSWORTH, P. A.; KRAMER, L. H.; FISHER, M. A. Canine leishmaniosis: an update. **The Veterinary Nurse**, v. 6, n. 3, p. 150–155, 2015.

HOMBACH, A.; CLOS, J. No stress – Hsp90 and signal transduction in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 141 n. 9, p. 1156-1166, 2014.
doi:10.1017/S0031182013002151

IKEDA-GARCIA FA, Feitosa MM. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clinica Veterinária**,; v. 11, n. 62, p. 32-33, 2006.

IYER, G. *et al.* A phase I trial of docetaxel and pulse-dose 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with solid tumors. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

JOHNSTON, J. S. *et al.* Development and validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy assay for determination of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin and 17-(amino)-17-demethoxygeldanamycin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 871, n. 1, p. 15–21, 2008.

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

KILLICK-KENDRICK, R.; Molyneux, DH. Transmissão da leishmaniose pela picada de flebotomíneos: mecanismos possíveis. **Transações da Sociedade Real de Medicina Tropical e Higiene**, 1 ed. 1981. v.75, p. 152-154. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90051-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90051-1)

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J.A. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of Leishmania infantum in Phlebotomus ariasi. **Parassitologia**, v. 44, n. 1-2, p. 67-71, 2002.

KIP, ANKE E. *et al.* Revisão sistemática de biomarcadores para monitorar a resposta terapêutica na leishmaniose. **Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia**, v. 59, n. 1, p. 14, 2015.

KOUTINAS, A F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–83, 1999.

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

KOUTINAS, A. F. *et al.* Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with Leishmania infantum. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 572–577, 2010.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to Leishmania infantum/chagasi. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.

KRISHNAN, K; WHITE, P. Pharmacokinetics and toxicokinetics. In: HASCHEK, W. M. *et al.* (Ed.) Haschek and rousseaux's handbook of toxicologic pathology. 3rd. Boston: Academic Press, 2013. cap. 2.

LAURENTI, M. D. *et al.* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAURICELLA, M. A. *et al.* An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Latin America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 92–98, 2016.

LI, Q. *et al.* Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1539–1548, 2009.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3–4, p. 377–387, 2008.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. *et al.* Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120–126, 2016.

MANNA, L. *et al.* Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

MANNA, L. *et al.* Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279–282, ago. 2008.

MANNA, L. *et al.* Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 3, p. 441–445, 2009.

MAROLI, M. *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1200–1206, 2010.

MARZOCHI, M. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349–57, 1985.

MATTIN, M. J. *et al.* The frequency and distribution of canine leishmaniasis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 3, p. 410-419, 2014.

METTLER, M. *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmania infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, 2005.

MIRÓ, G. *et al.* Miltefosine: A new treatment for canine leishmaniasis. In: **Abstract book of Third World Congress on Leishmaniasis**. Sicília, 2005, 171 p.

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

MIYATA, Y.; NAKAMOTO, H.; NECKERS, L. The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 3, p. 347–365, 2012.

MODI, S. *et al.* Combination of trastuzumab and tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in trastuzumab-refractory HER-2-overexpressing breast cancer: A phase I dose-escalation study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 34, p. 5410–5417, 2007.

MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally Phlebotomus perniciosus infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491–493, 1994.

MOLL H. O papel das quimiocinas e células acessórias na imunorregulação da leishmaniose cutânea. **Behring Institute Mitteilungen**, n. 99, p. 73-78, mar. 1997.

MOREIRA, M. A. B. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–252, 2007.

NATHAN, D. F.; VOS, M. H.; LINDQUIST, S. In vivo functions of the Saccharomyces cerevisiae Hsp90 chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 12949–12956, 1997.

NECKERS, L.; SCHULTE, T.W.; MIMNAUGH, E. Geldanamycin as a Potential Anti-Cancer Agent: Its Molecular Target and Biochemical Activity. **Invest New Drugs**, v. 17, p. 361–373, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1006382320697>

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. ed 2. São Paulo: Atheneu, 2006.

NICOLE, C.H.; COMTE, C.H. Recherche sur le kala-azar enterprises al Institute Pasteur de Tunis.IV: origine canine kala-azar. **Arch Inst Pasteur Tunis**, v. 3, p. 59–62, 1908.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. Inf. Vet. **Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, p. 34-40, jun. 2005.

NOKER, P. E. *et al.* Toxicity and pharmacokinetics of 17-allylaminogeldanamycin (17-AAG, NSC-330507) in dogs. In: **Proceedings American Association Cancer Research**, 1999. p. 804.

NUGENT, P.; DUNCAN, J.N.; COLAGIOVANNI, D. B. The preparation of a preclinical dossier to support an investigational new drug (IND) Application and First-in-Human Clinical Trial. In: FAQI, A. S. **A comprehensive e guide to toxicology in preclinical drug development**. 1ª ed. Editora Elsevier, 2013. p. 318-333.

NUNES, C. M. *et al.* Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Brazilian Jouran Veterinary Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 67–71, 2007.

OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A. Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina [Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols]. **Parassitologia**, 46, n. 1-2, p. 231-234, 2004.

OSMAN, O. F. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2454–2457, 1997.

PAGE, J. *et al.* Comparison of geldanamycin (NSC-122750) and 17-allylaminogeldanamycin (NSC-330507D) toxicity in rats. In: **Proceeding American Association Cancer Research**, 1997. p. 308.

PALIS, P. H. *et al.* **Quadro clínico de cães infectados naturalmente por Leishmania chagasi em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil**, v. 8, n. 4, p. 283–294, 2007.

PENNISI, M. G. *et al.* Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 29, Suppl. 2, p. 301–303, 2005.

PETERSEN, A. L. DE O. A. *et al.* 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.

PETERSEN, A. L. de O. A. *et al.* Encapsulation of the HSP-90 Chaperone Inhibitor 17-AAG in Stable Liposome Allow Increasing the Therapeutic Index as Assessed, in vitro, on Leishmania (L) amazonensis Amastigotes-Hosted in Mouse CBA Macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 303, 2018.

PINHÃO, C. P. R. **Leishmaniose Canina - Estudo de 158 casos da região de Lisboa**. n. 1c, 2013.

PRODROMOU, C. *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65–75, 1997.

RAI, A. K. *et al.* Enrichment of invariant natural killer T cells in the bone marrow of visceral leishmaniasis patients. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 12, p. 688–691, 2011.

RAMANATHAN, R. K. *et al.* Phase I and pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with refractory advanced cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1769–1774, 2007.

RAMANATHAN, R. K. *et al.* Phase I pharmacokinetic-pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, NSC 330507), a novel inhibitor of heat shock protein 90, in patients with refractory advanced cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3385–3391, 2005.

RAMPAZZO, R. DE C. P. *et al.* A ready-to-use duplex qPCR to detect Leishmania infantum DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, n. September, p. 100–107, 2017.

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

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 151–177, 1995.

RIBEIRO, R. R. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, 2018.

RICHARDSON, P. G. *et al.* Results of a Phase 1 Dose-Escalation Study. **British Journal of Haematology**, v. 150, n. 4, p. 438–445, 2011.

ROURA, X.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, n. 10, p. 262–264, 1999.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261, 1903.

RUSSELL, B. Y. D. G.; WRIGHT, S. D. Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of leishmania promastigotes *Leishmania* is an obligate intracellular parasite that survives within the phagolysosomes of its vertebrate hosts' macrophages (1-3). Once the promasti. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 279–292, jul. 1988.

SAIF, M. W. *et al.* Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin [17-AAG]) in patients with solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1345–1355, 2013.

SANTOS, D. M. *et al.* Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (viannia) braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

SANTOS, N. C. *et al.* Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.

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

SAUSVILLE, E.; TOMASZEWSKI, J.; IVY, P. Clinical Development of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, n. 5, p. 377–383, 2005.

SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 273–279, 1998.

SHARMA, S. V.; AGATSUMA, T.; NAKANO, H. Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol. **Oncogene**, v. 16, n. 20, p. 2639–2645, 1998.

- SHAW, S. E.; LANGTON, D. A; HILLMAN, T. J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 4, p. 281–5, 26 ago. 2009.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671–83, 1996.
- SILVA, A. V. M. DA *et al.* Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 324–328, 2005.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285–91, abr. 2001.
- SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (glucantime®) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Veterinary Quarterly**, v. 19, n. 1, p. 10–13, 1997.
- SMITH, B. P. *et al.* Confidence Interval Criteria for Assessment of Dose Proportionality. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p.1278–1283, 2000.
- SOARES, M. R. A. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 6–9, jan. 2011.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, out. 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, jan. 2011.
- SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 1 fev. 2001.
- SOLIT, D. B. *et al.* Phase I Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Patients with Advanced Cancer. **Clin Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1775–1782, 2007.
- STEGEMANN, M. R.; SHERINGTON, J.; BLANCHFLOWER, S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 501–511, 2006.
- SUDARSHAN, M. *et al.* Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1751–1755, 2011.
- TALAEI, S. *et al.* Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 93, n. 5, p. 760–786, 2019.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. **Molecular diagnosis of leishmaniasis**. v. 4, p. 1–14, 2003.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania***. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64p.

TEIXEIRA-NETO, R. G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: An ecological study involving spatial analysis. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

TORRES, M. *et al.* Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 346–351, 2011.

USMANI, S.; BONA, R.; LI, Z. 17 AAG for HSP90 Inhibition in Cancer – From Bench to Bedside. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 654–664, 2009.

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

VENTURIN, G. L. *et al.* Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 12, p. 670–673, 2015.

VERÇOSA, B. L. A. *et al.* Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1–7, 2008.

WHITESELL, L. *et al.* Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60(v-src) heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8324–8328, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. In: **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis**. World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. WHO, mar. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 10 de out. de 2018.

WOERLY, V. *et al.* Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 463–469, 2009.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004.

XU, Y. *et al.* The HSP90 inhibitor 17-AAG exhibits potent antitumor activity for pheochromocytoma in a xenograft model. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5103–5108, 2015.