



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação in vitro da atividade anti-Leishmania
de compostos sintéticos

Andreia Patrícia Moreira Mendes

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade
em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

MARÇO, 2019

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação in vitro da atividade anti-Leishmania
de compostos sintéticos

Autor: Andreia Patrícia Moreira Mendes

Orientador: Doutora Sofia Cortes

Co-orientadores: Professora Doutora Lenea Campino e Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biomédicas, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Este trabalho foi realizado no Grupo de Leishmanioses da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do IHMT, no âmbito do projeto PERLEISH enquadrado no programa Investigador FCT (IF/0773/2015) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência.”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais que foram meus primeiros instrutores e os principais responsáveis por me fazerem chegar até aqui, e que, apesar de fisicamente não estarem mais aqui para me ajudarem a tomar as melhores decisões e descobrir minhas vocações jamais deixarão de ser minha referência de amor, compreensão e caráter.

À minha orientadora, Doutora Sofia Cortes pela confiança, por ter sido muito mais que orientadora e que ao longo deste período dedicou seu tempo me ensinando, tornando possível a conclusão desta tese.

À Prof.^a Doutora Lenea Campino pelos ensinamentos, amizade e boa disposição.

À Prof.^a Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano pela cedência dos compostos utilizados neste estudo e pela disponibilidade de ajuda na revisão crítica desta tese.

A toda equipa do laboratório de Leishmanioses pela partilha de conhecimentos e disposição de ajuda imediata.

Aos meus irmãos, familiares e amigos por tornarem a minha vida muito mais feliz.

A todos os professores do curso do Mestrado em Ciências Biomédicas, pela valiosa contribuição na minha formação académica.

Aos colegas de Mestrado, principalmente aqueles que se tornaram meus amigos pela união, companheirismo, desafios e alegrias compartilhadas.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do género *Leishmania* e transmitida aos hospedeiros vertebrados por vetores flebotomíneos. Está associada a taxas de morbidade e mortalidade global significativas, cujas estratégias atuais de controlo são principalmente baseadas na quimioterapia, que presentemente apresenta opções terapêuticas limitadas com elevada toxicidade, eficácia decrescente e resistência crescente, tornando cada vez mais relevante a procura de compostos com atividade anti-*Leishmania* que sejam de fácil administração, seletivos e com elevado índice terapêutico. No presente trabalho foram realizados ensaios *in vitro* com peróxidos sintéticos - 6 trioxolanos, 6 tetraoxanos e 4 derivados de artemisinina - em diferentes concentrações, para avaliar a atividade leishmanicida. Destes, foram selecionados os que apresentaram menor CI50 contra as formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/PT/88/IMT151), *Leishmania donovani* (MHOM/BD/2006/BD14) e *Leishmania tropica* (MHOM/PS/2002/63jnF21) e foram submetidos a testes contra as formas amastigotas intracelulares. A anfotericina B, miltefosina e a pentamidina foram usadas como controle positivo. Também foi avaliada a citotoxicidade dos compostos em linhagens de células monocíticas/ macrofágicas J774.A1 e THP-1, utilizando o método colorimétrico com metil-tiazol-tetrazólio (MTT). Os resultados demonstraram que a maioria dos compostos pesquisados apresentaram baixa citotoxicidade contra as linhas celulares em estudo e níveis variados de ação leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas das diferentes espécies, sendo que, no entanto, a forma amastigota se apresentou mais sensível aos compostos testados. Observou-se que em concentrações micromolares o tetraoxano LC138 demonstrou uma melhor atividade contra as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* (CI50 = 23,19 µM), apresentando um índice de seletividade de 22,8 o que indica ser este um composto promissor para estudos adicionais. Foi também avaliado o efeito dos compostos LC132, LC137 e LC138 na morfologia das formas promastigotas de *L. infantum*, observando-se alterações no tamanho do flagelo, tamanho médio e desorganização citoplasmática.

Palavras-chave: *Leishmania* spp, atividade anti-*Leishmania in vitro*, compostos peroxídicos sintéticos, MTT, análise morfométrica.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by a protozoan belonging to the genus *Leishmania* and is transmitted by the bite of sand flies (genus *Phlebotomus*). It is associated with significant global morbidity and mortality rates whose current control strategies are primarily based on chemotherapy, which currently presents limited therapeutic options, involving high level of toxicity and decreasing efficacy due to increasing resistance. Thus, the search for compounds with antileishmanial activity, which can be easily administrated, are selective and show high therapeutic index, is imperative. In this work, *in vitro* tests were performed by screening synthetic peroxides - 6 trioxolanes, 6 tetraoxanes and 4 artemisinin derivatives - at different concentrations, to evaluate their leishmanicidal potential. The compounds that evidenced lower CI50 values against promastigote forms of *Leishmania infantum* (MHOM/PT/88/IMT151), *Leishmania donovani* (MHOM/BD/2006/BD14) and *Leishmania tropica* (MHOM/PS/2002/63jnF21) were selected for further tests against intracellular amastigote forms. Amphotericin B, miltefosine and pentamidine were used as positive controls. The cytotoxicity of the compounds was also evaluated in monocyte/ macrophage cell lines J774.A1 and THP-1, by using the colorimetric assay methyl-thiazole-tetrazolium (MTT). The results showed that most of the compounds studied presented low cytotoxicity against the cell lines under study and varied levels of antileishmanial activity against promastigotes and amastigotes of different species, with the amastigote forms showing comparatively higher sensitivity to the tested compounds. It was observed that, in the micromolar range of concentrations, the tetraoxane LC138 showed the best activity against intracellular amastigotes of *L. infantum* (with CI50 = 23,19 μ M), presenting a selectivity index of 22,8 and was selected as a promising compound for further studies. The effects of compounds LC132, LC137, LC138 on the morphology of the *L. infantum* promastigotes were evaluated and changes in flagellum size, medium size and cytoplasmic disorganization were observed.

Key-words: *Leishmania* spp, *in vitro* anti-*Leishmania* activity, synthetic peroxides, MTT, morphometric analysis.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES	VII
OBJETIVOS	IX
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmanioses.....	1
1.1.1. Resenha histórica.....	1
1.1.2. Epidemiologia.....	2
1.1.3. Formas clínicas	6
1.2. O parasita <i>Leishmania</i>	10
1.2.1. Ciclo de vida.....	11
1.2.2. Hospedeiros	13
1.3. Interação parasita-hospedeiro	15
1.4. Diagnóstico laboratorial.....	16
1.5. Fármacos usados no tratamento das leishmanioses	18
1.6. Desenvolvimento de novos fármacos para tratamento das leishmanioses	21
1.7. Estudos “in vitro”	22
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Parasitas <i>Leishmania</i>	25
2.2. Manutenção das culturas celulares.....	26
2.3. Preparação dos compostos	27
2.4. Avaliação da citotoxicidade dos compostos	27
2.5. Efeito dos compostos nos promastigotas	28

2.6. Efeito dos compostos no sistema macrófago-amastigota	29
2.7. Determinação do índice de seletividade	30
2.8. Integridade do DNA dos promastigotas.....	31
2.9. Análise morfométrica das formas promastigotas em microscopia ótica	32
2.10. Análise estatística	32
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos nas linhas celulares THP-1 e J774.A1	33
3.2. Avaliação da suscetibilidade das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> aos compostos testados e determinação dos índices de seletividade	35
3.3. Avaliação do efeito dos compostos no sistema amastigota-macrófago e determinação do índice de seletividade	37
3.4. Avaliação da integridade do DNA das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> ..	41
3.5. Alterações morfológicas das formas promastigotas	42
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses.....	3
Figura 2: Aspectos epidemiológicos da LC no mundo.....	7
Figura 3: Aspectos epidemiológicos da LV no mundo.....	8
Figura 4: Manifestações clínicas das leishmanioses.....	9
Figura 5: Organização estrutural das formas amastigota e promastigota.....	11
Figura 6: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	12
Figura 7: Fêmea de <i>Phlebotomus papatasi</i>	14
Figura 8: Representação esquemática da câmara de Neubauer.....	26
Figura 9: Linha celular J774.A1 infetada com formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (A=400x e B=1000x).....	37
Figura 10: Atividade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i>	39
Figura 11: Alterações morfológicas induzidas em promastigotas de <i>L. infantum</i>	43
Figura 12: Efeito dos compostos LC132, LC137, LC138 sobre as formas promastigotas <i>L. infantum</i>	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> , sua distribuição geográfica e formas clínicas no homem.....	4
Tabela 2: Valores de concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC50), nas linhagens J774.A1 e THP-1, após 48 h de tratamento.....	34
Tabela 3: CC50, CI50 e IS dos compostos testados em formas promastigotas de <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. tropica</i> e na linhagem celular J774.A1.....	36
Tabela 4: Valores de CI50 e IS dos compostos testados em formas amastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> e na linhagem J774.A1.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

AmB	Anfotericina B
ATS	Artesunato
CC50	Concentração citotóxica para 50% de células
CI50	Concentração inibitória para 50% dos microrganismos
Deoxy-ATS	Artesunato desoxigenado
Deoxy-DHA	Di-hidroartemisinina desoxigenada
DHA	Di-hidroartemisinina
DMEM Medium	Meio de cultura líquido, do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA assay	Ensaio imuno-enzimático, do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
FCS	Soro fetal bovino
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
HAART	Terapêutica anti-retroviral altamente ativa
LC	Leishmaniose Cutânea
LCan	Leishmaniose Canina
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
MSP	Protease de Superfície Principal
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5difeniltetrazólio
ON	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino

PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar
PMA	“Phorbol 12-myristate 13-acetate”
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI 1640	Meio de cultura líquido, do inglês “Roswell Park Memorial Institute”
IS	Índice de Seletividade
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
μM	Micrómetro
μL	Microlitro

OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito leishmanicida de uma biblioteca de compostos peroxídicos sintéticos em diferentes espécies de *Leishmania*. Para determinação do índice de segurança dos compostos em estudo, procedeu-se à determinação do seu efeito citotóxico em linhas celulares.

Como objetivos específicos pretendeu-se:

1. Avaliar a citotoxicidade dos compostos em duas linhas celulares macrofágicas;
2. Avaliar a suscetibilidade *in vitro* em promastigotas de três espécies de *Leishmania* - *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica* - aos diferentes compostos testados;
3. Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de amastigotas intracelulares de *L. donovani* e *L. infantum* aos compostos selecionados;
4. Determinar os índices de seletividade dos compostos;
5. Avaliar a integridade do DNA dos promastigotas de *L. donovani* e de *L. infantum* na presença das concentrações correspondentes aos CI50 dos diferentes compostos testados;
6. Avaliar as alterações morfológicas dos promastigotas de *L. infantum* na presença das concentrações correspondentes ao CI50 dos compostos que revelarem melhor atividade *in vitro*.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

1.1.1. Resenha histórica

Os primeiros registos das leishmanioses datam de 2.500 a.C.. Contudo, as primeiras observações, descrições e posterior identificação do agente etiológico da leishmaniose só surgiram a partir do Século XIX, na sequência de pesquisas realizadas por diversos médicos e investigadores, de que se destaca Cunningham, Borovsky, Ross, Leishman, Donovan, Whright, Laveran, Mesnil, Linderberg e Vianna (revisto em Akhoundi *et al.*, 2016).

David D. Cunningham (1843-1914) foi o primeiro a observar formas amastigotas de *Leishmania*, em 1885, na Índia, ao estudar um caso de Kala-azar num paciente indiano (revisto em Steverding, 2017).

Posteriormente, em 1898, o médico russo Piotr Fokich Borovsky (1863-1932), procedendo a estudos mais detalhados deste agente, num paciente que apresentava lesões semelhantes às descritas por Cunningham, demonstrou que o agente etiológico do botão do oriente era um protozoário (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).

Em 1901, William Boog Leishman (1865-1926) e Charles Donovan (1863-1951) descreveram cientificamente o parasita causador da leishmaniose visceral (LV) ou Kala-azar e, em 1903, Ronald Ross (1857-1932), um prestigiado médico e investigador inglês, atribui-lhe a designação de *Leishmania donovani*, em homenagem aos dois médicos.

Leonard Rogers (1868-1962), em 1904, conseguiu cultivar com sucesso as formas flageladas do parasita. Em 1907, Willian S. Patton (1876-1960) observou a presença de corpos de Leishman-Donovan (formas amastigotas) nos linfócitos do sangue periférico e das suas formas flageladas (formas promastigotas) no intestino dos flebótomos (revisto em Akhoundi *et al.*, 2016).

O parasita causador da LV, *Leishmania infantum*, foi descrito em 1908 pelo bacteriologista francês Charles J. H. Nicolle (1866-1936), na Tunísia, em crianças que

sofriam de anemia esplênica. No mesmo ano, juntamente com seu colega Charles Comte, isolaram o parasita em cães infetados, em Túnis. Em 1941, o parasitologista britânico-israelense Saul Adler, demonstrou experimentalmente que o modo de transmissão da *Leishmania* ocorre através da picada de flebotomíneos (revisto em Akhoundi *et al.*, 2016; Steverding, 2017).

A partir da primeira metade do século XX até ao presente, vários foram os investigadores e estudos que permitiram descrever as relações evolutivas entre flebotomíneos, *Leishmania* e os reservatórios animais associados, bem como padrões de transmissão da *Leishmania* e epidemiologia das leishmanioses.

1.1.2. Epidemiologia

As leishmanioses são um complexo de doenças cujos agentes etiológicos são protozoários unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, género *Leishmania* Ross, 1903. Estes parasitas digenéticos são transmitidos a hospedeiros mamíferos através da picada de insetos vetores flebotomíneos da família Psychodidae, género *Phlebotomus* Rondani, 1843 ou *Lutzomyia* França, 1924 (Neves *et al.*, 1997; Gramiccia, 2011; Akhoundi *et al.*, 2016; Hefnawy *et al.*, 2017).

Esta doença tropical negligenciada (DTN) apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e pessoas afetadas por VIH/SIDA (Alvar *et al.*, 2006) .

As leishmanioses são endémicas em todos os continentes, exceto na Austrália e na Antártica, e estão presentes em 98 países ou territórios (Figura 1), sendo a prevalência/incidência maior em países do Sudeste Asiático, da África sub-Sahariana e da América Latina (com mais de 90% dos casos registados) e sendo também endémicas em vários países do sul da Europa. A prevalência global atinge os 12 milhões de infetados, existindo cerca de 350 milhões de pessoas em risco. Em cada ano, 500 mil desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença (WHO, 2015, 2017b).

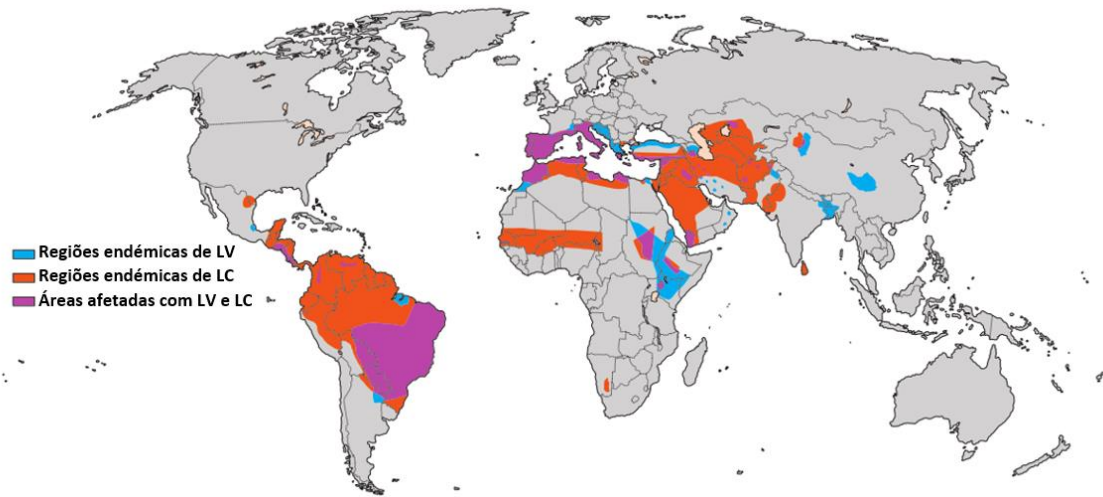


Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses. (Adaptado de Davidson, 2017)

Na Europa, Ásia e Norte de África a infecção por *L. infantum* constitui uma zoonose relevante, em que os cães são o principal reservatório da infecção humana, assumido grande relevância veterinária. Para além dos cães sintomáticos, os assintomáticos também representam um risco para os seres humanos, pois constituem uma fonte de transmissão para o vetor flebotomíneo (Dujardin *et al.*, 2008; Campino e Maia, 2010).

A leishmaniose também vem sendo relatada nos felinos, particularmente em gatos. Nos últimos anos, a infecção assintomática ou doença clínica causada por *L. infantum* em gatos foi relatada em vários países onde a leishmaniose zoonótica está presente, onde são frequentemente expostos ou infetados pelo parasita (Maia, *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2010; Otranto e Dantas-Torres, 2013; Ribeiro, 2014; Neto *et al.*, 2015; Pennisi, 2015).

O género *Leishmania* inclui cerca de 30 espécies diferentes com distribuição limitada à do vetor que é determinada geograficamente, sendo os flebotomíneos do género *Phlebotomus* responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomya* no Novo Mundo (Tabela 1), (Lainson e Shaw, 1972; Piscopo *et al.*, 2007; Akhoundi *et al.*, 2016).

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania*, sua distribuição geográfica e formas clínicas no homem.

<i>Vetor</i>	<i>Leishmania</i> sp	Distribuição Geográfica	Patologia
Novo Mundo	<i>Lutzomyia spp</i>		
	<i>L. lainsoni</i>	Brasil, Perú e Bolívia	LC
	<i>L. naiffi</i>	Brasil, Guiana Francesa	LC
	<i>L. shawi</i>	Brasil	LC
	<i>L. peruviana</i>	Perú, Bolívia	LC, LMC
	<i>L. guyanensis</i>	Norte da América do Sul, Brasil, Bolívia, Guiana Francesa, Suriname	LC, LMC
	<i>L. panamensis</i>	América Central e do Sul, Brasil, Panamá, Venezuela, Colombia	LC, LMC
	<i>L. braziliensis</i>	América do Sul, Brasil, Bolívia, Perú, Venezuela	LC, LMC
	<i>L. infantum syn. L. chagasi</i>	América Central e do Sul	LV
<i>L. mexicana</i>	EUA, Equador, Perú, Venezuela	LC, LCD	
Velho Mundo	<i>Phlebotomus spp</i>		
	<i>L. infantum</i>	Bacia Mediterrânea, Norte de África, Ásia Central, Noroeste da China	LV, LC
	<i>L. donovani</i>	África Central, Índia, Médio Oriente, Oeste da China, Sul da Ásia.	LV, PKDL
	<i>L. major</i>	África Central e do Norte, Médio Oriente, Ásia Central	LC
	<i>L. tropica</i>	Bacia Mediterrânea, Afeganistão, Norte de África, Médio Oriente, Índia e Paquistão	LC
<i>L. aethiopica</i>	África Central (Etiópia, Quênia)	LC, LCD	

LC – Leishmaniose Cutânea; LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa; LMC – Leishmaniose Mucocutânea; LV – Leishmaniose Visceral; PKDL – Leishmaniose dérmica pós Kala-azar.

Leishmaniose em Portugal

Em Portugal o primeiro caso autóctone de LV foi descrito por Alvares (1910), referindo-se a uma menina de 9 anos de idade (Campino *et al.*, 2006). Um ano depois, o mesmo autor relatou a ocorrência de leishmaniose canina em Lisboa. A partir da década de 50, com o aumento acentuado da incidência de LV por todo o país, a doença passou a ser de declaração obrigatória. A LC é conhecida desde 1943, quando foi descrita na Região do Alto Douro (Campino *et al.*, 2006). Esta forma da doença é pouco frequente em Portugal, encontrando-se predominantemente em indivíduos imunocompetentes (Campino e Abranches, 2002).

A partir de 1980, Abranches e col., realizam diversos inquéritos epidemiológicos, que permitiram identificar três focos principais: Trás-os-Montes e Alto Douro, região de Lisboa e região do Algarve (Campino *et al.*, 2006; Branco *et al.*, 2013). Estudos posteriores realizados por Cortes *et al.* (2012) permitiram identificar novas áreas endémicas relevantes na leishmaniose canina: Beja, Castelo Branco e Portalegre e registando maior prevalência nos distritos do interior de Portugal em comparação com o litoral e, ao longo dos anos observa-se um aumento na prevalência de casos de Lcan (Cortes *et al.*, 2007, 2012). Estes resultados confirmam a importância do papel dos cães na transmissão da doença, principalmente na região metropolitana de Lisboa.

A forma predominante da doença é a visceral causada por vários zimodemes de *L. infantum*, sendo o zimodeme MON-1 o mais prevalente e o principal reservatório o cão. A transmissão ocorre através da picada de insetos flebotomíneos infetados com o parasita, sendo *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* as espécies vetoras em Portugal (Campino *et al.*, 2005; Campino e Maia, 2010).

Nas últimas décadas verificou-se uma mudança na epidemiologia da LV no país, passando de uma doença predominantemente infantil a infeção em adultos, principalmente associada a casos de VIH (Campino e Maia, 2010). Entre os anos de 1999 e 2014 foram diagnosticados no Laboratório de Leishmanioses - IHMT, 199 casos de leishmaniose visceral, 122 em indivíduos adultos imunodeprimidos e 27 casos de leishmaniose cutânea (Maia e Campino, 2014).

1.1.3. Formas clínicas

As principais formas clínicas da leishmaniose são: visceral, cutânea (simples ou difusa) e mucocutânea (WHO, 2017b). As formas cutâneas e mucocutâneas podem causar lesões desfigurantes na pele e mucosas e a forma visceral pode ser fatal se não for tratada.

Leishmaniose cutânea (LC)

É a forma mais comum da doença (Aronson *et al.*, 2016), representando 50 a 75% dos novos casos registados. Caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas localizadas - leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou difusas - leishmaniose cutânea difusa (LCD), com úlceras nas partes expostas do corpo, como o rosto, os braços e as pernas (Maurer *et al.* 2009, Davidson, 2017).

As lesões podem desenvolver-se num período de algumas semanas ou meses após a picada do flebótomo e na maioria dos casos têm cura espontânea, embora a gravidade da doença e evolução para a cura possam variar, dependendo da espécie do parasita infetante e do estado imunológico do indivíduo infetado, deixando cicatrizes permanentes (Farah *et al.*, 1975; David e Craft, 2009; Okwor e Uzonna, 2016).

Cerca de 90% dos casos de LC ocorrem na Síria, Sul da Arábia, Irão, Afeganistão, Argélia, Brasil e Perú (Figura 2). No Novo Mundo a LC é causada por *L. mexicana*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. No Velho Mundo as principais espécies responsáveis pela LC são *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica*, (Grevelink e Lerner, 1996; Mansueto *et al.*, 2007; Ready, 2014). Embora menos frequente, *L. infantum* também é responsável por LC na Bacia Mediterrânica e em países da ex-União Soviética (Campino *et al.*, 2005, 2006).

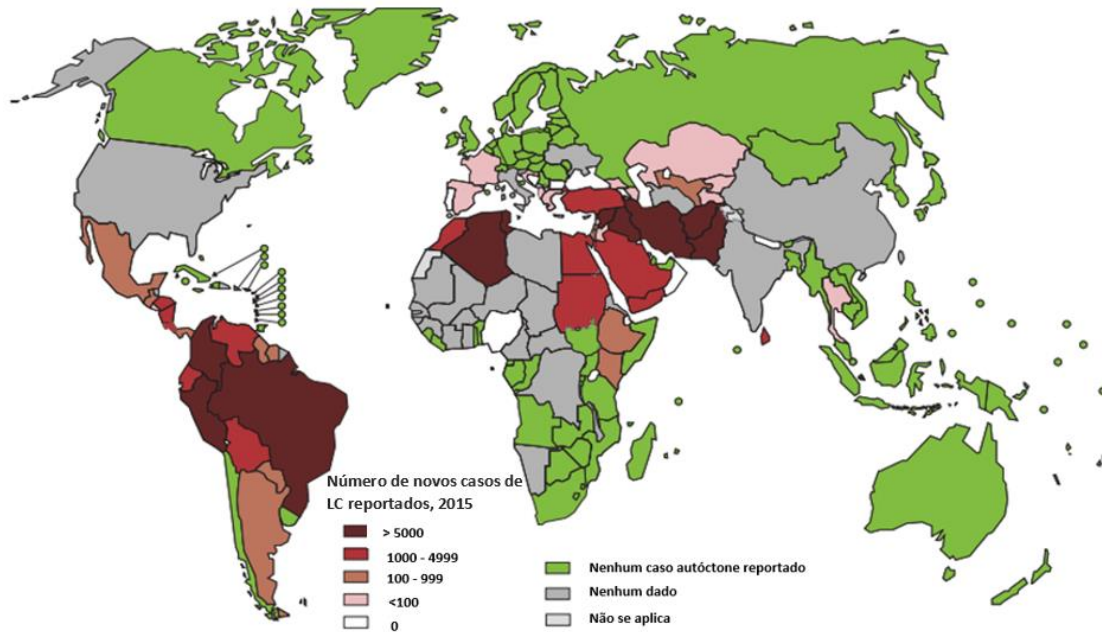


Figura 2: Aspectos epidemiológicos da LC no mundo (OMS, 2015)

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1 – em 09-01-2018

Leishmaniose mucocutânea (LMC)

Esta forma clínica da leishmaniose ocorre meses ou anos após a cura de leishmaniose cutânea primária, devido à disseminação linfática ou hematogénica de amastigotas da pele para a mucosa nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e trato respiratório superior, provocando lesões que podem levar à destruição parcial ou total das mucosas e tecidos circundantes (Figura 4) (Soares-Bezerra *et al.*, 2004; WHO, 2010).

Na América Central e do Sul, onde esta forma da doença é prevalente, o principal agente etiológico associado é a *L. (V.) braziliensis*. No entanto, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* também foram associadas a casos de LMC (Guerra *et al.*, 2011).

Leishmaniose visceral (LV)

A LV, também conhecida na Ásia por “febre negra” ou kala-azar, pode ser fatal se não for tratada, sendo considerada a forma mais grave da doença. Embora a doença seja endêmica em mais de 60 países, com 200 milhões de pessoas em risco, 90% dos 500 000 novos casos que ocorrem anualmente acontecem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, (Alvar *et al.* 2012). Os agentes etiológicos responsáveis por esta forma da doença são: *L. donovani*, encontrada geograficamente na Índia, Ásia e África, de transmissão antroponótica; *L. infantum* presente na China, Ásia Central, África Oriental, Sul da Europa, países da Bacia Mediterrânea e América do Sul (WHO, 2010). Embora raros, foram descritos casos de LV causados por *L. tropica* no Irão, Quênia, Índia, Marrocos (Neves *et al.*, 1997; Alborzi, *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 2009; Saporito *et al.*, 2013).

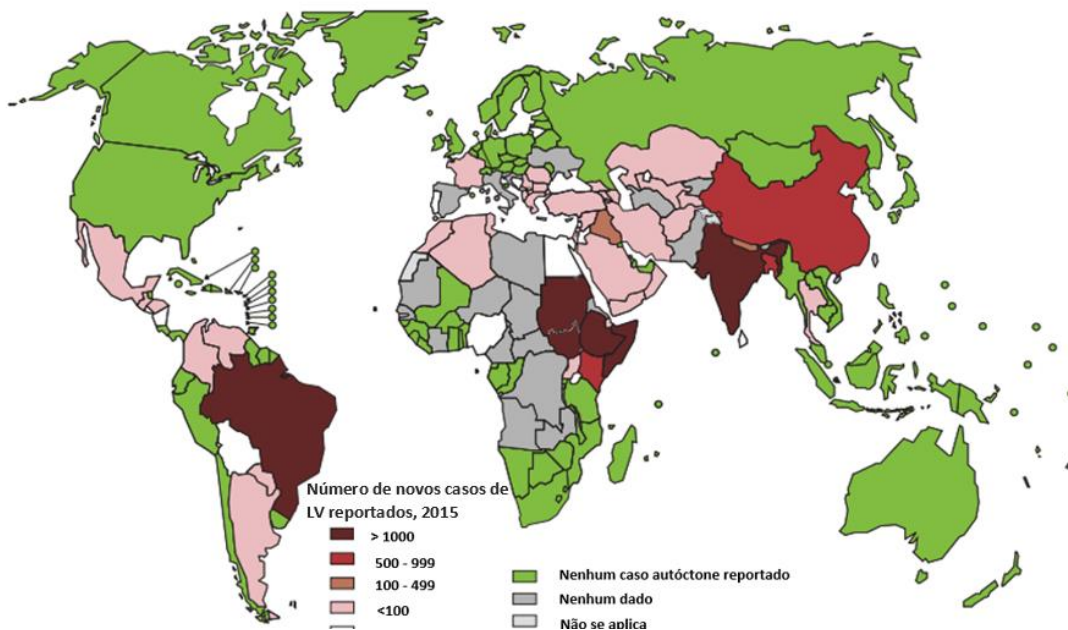


Figura 3: Aspectos epidemiológicos da LV no mundo.

(Fonte:http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1 – em 09-01-2018)

A LV afeta o fígado e o baço, causando hepatoesplenomegalia (Figura 4), com episódios irregulares de febre e perda de peso. Devido ao envolvimento do sistema hematopoiético na medula óssea, os pacientes apresentam anemia severa, com leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (Oren *et al.*, 1991; Ready, 2014). A LV também pode aparecer como recidiva (até 12 meses após a cura clínica) ou reativação tardia da infecção subclínica ou tratada previamente.

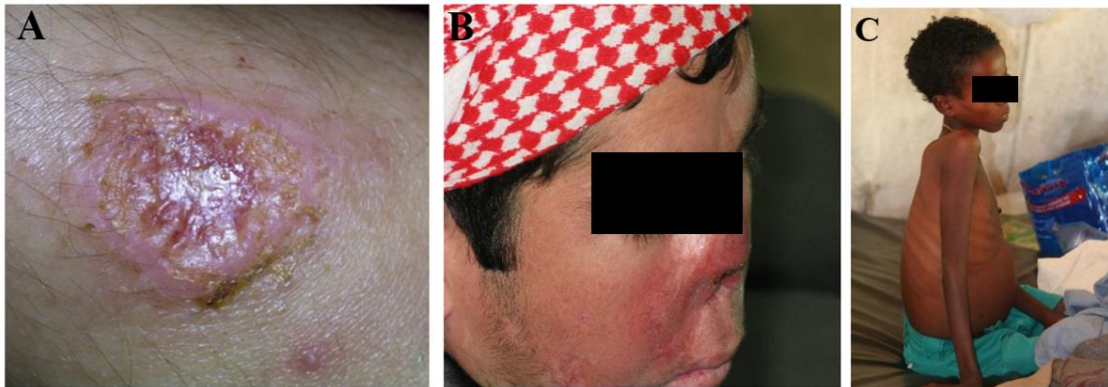


Figura 4: Manifestações clínicas das leishmanioses. **A** - lesão característica em LC, **B** - LMC desfigurante e **C** - LV com evidências de hepatoesplenomegalia. (Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/).

Co-infecção por *Leishmania* e VIH

A infecção concomitante por *Leishmania* e VIH tem importantes implicações clínicas e epidemiológicas.

O VIH aumenta a suscetibilidade para o desenvolvimento da patologia visceral. Até 2013, foram reportados casos de co-infecção em 35 países endêmicos, sendo a maioria registada no sudoeste da Europa (Boelaert e Sundar, 2014). A introdução da terapia anti-retroviral (HAART) em 1997 permitiu reduzir o número de casos de leishmaniose em doentes com VIH/SIDA (Campino e Maia, 2010; Boelaert e Sundar, 2014; Monge-Maillo *et al.*, 2014). O risco de contrair infecção concomitante por LV e VIH é maior em indivíduos usuários de drogas intravenosas, devido à partilha de agulhas e seringas (Desjeux e Alvar, 2003).

Em geral, as manifestações clínicas da leishmaniose visceral em pacientes imunocomprometidos são semelhantes às observadas em pacientes imunocompetentes, mas o envolvimento gastrointestinal, a diarreia, é mais frequentemente relatado. As diferenças mais significativas são a resposta reduzida ao tratamento, o aumento da toxicidade dos medicamentos, taxas mais altas de casos de recidivas quando comparadas a pacientes com LV negativos para VIH (Monge-Maillo *et al.*, 2014).

1.2. O parasita *Leishmania*

O parasita *Leishmania* (Ross, 1903), pertencente à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, é um organismo unicelular caracterizado pela presença de um flagelo e de um organelo rico em DNA, o cinetoplasto, representando uma mitocôndria modificada, e reproduz-se por fissão binária (Gramiccia, 2011).

São digenéticos, apresentam duas formas durante o seu ciclo de vida, que se diferenciam tanto em relação à sua morfologia quanto à sua motilidade e características biológicas. As formas promastigotas são alongadas, com flagelo livre emergindo da porção anterior do parasita e com grande mobilidade encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados - flebotomíneos. A morfologia do promastigota varia de acordo com o estadio de crescimento dentro do trato digestivo do flebotomíneo, cujo tamanho varia entre 15 e 30µm (Boelaert e Sundar, 2014). O cinetoplasto, região especializada da única mitocôndria encontrada nesses parasitas, possui a forma de bastonete, localiza-se na porção mediana, entre a extremidade anterior e o núcleo. Contém grande quantidade de DNA, o DNA cinetoplastideal (kDNA), organizado em estruturas circulares, com um formato de anéis entrelaçados composto por maxicírculos e minicírculos (Simpson, 1987; Chen *et al.*, 1995). O núcleo situa-se na região mediana do corpo. O flagelo apresenta medidas iguais ou superiores ao maior diâmetro do corpo (Figura 5), fornece um meio de motilidade e ligação dentro do intestino do flebotomíneo, funções críticas para transmissão através do inseto vetor (Cuvillier *et al.*, 2003).

As formas amastigotas são ovóides, imóveis e sem flagelo, medem cerca de 2,1 e 3,2 µm (Figura 5) e obrigatoriamente parasitam as células do sistema mononuclear fagocítico dos hospedeiros vertebrados (Neves *et al.*, 1997). A membrana apresenta uma

invaginação na região anterior do corpo, formando a bolsa flagelar, onde se localiza o flagelo.

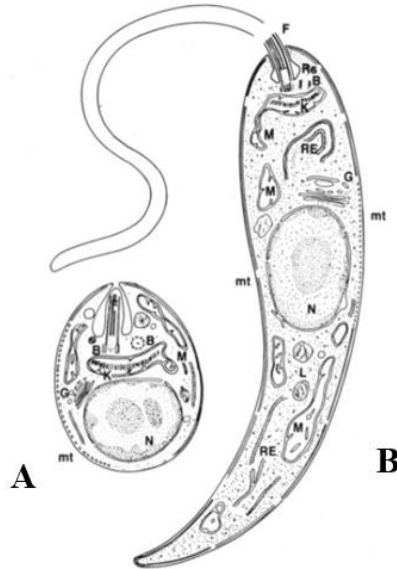


Figura 5: Organização estrutural das formas amastigota (A) e promastigota (B): B – blefaroplastos; F – flagelo; G – aparelho de Golgi; K – cinetoplasto; N – núcleo; M – mitocôndrias; RE – retículo endoplasmático; Rs – bolsa flagelar; L – inclusões lipídicas. Adaptado de Rey, 2010.

1.2.1. Ciclo de vida

As leishmanioses resultam da transmissão das formas infetantes da *Leishmania* – promastigotas metacíclicas - presentes no probóscide do flebótomo, aos hospedeiros mamíferos, quando a fêmea efetua a sua refeição sanguínea.

Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, transformando-se em amastigotas e multiplicando-se por fissão binária até romperem a célula hospedeira (Figura 6), sendo fagocitadas por novas células do sistema mononuclear fagocítico.

A infecção dos flebotomíneos ocorre novamente quando, no momento da refeição sanguínea. Os amastigotas, no sistema digestivo do inseto, agrupam-se para formar agregados, protegidos por uma estrutura chamada matriz peritrófica que envolve a

refeição sanguínea e a protege das enzimas digestivas e se diferenciam em promastigotas procíclicas após 24 a 28 horas. Posteriormente, a porção anterior da matriz peritrófica degrada-se e os promastigotas são libertos no epitélio do intestino médio do inseto, reproduzindo-se por processos sucessivos de fissão binária. Seguidamente migram para a válvula estomodeal do inseto e por um processo de diferenciação chamado de metaciclo-gênese começam transformar-se em formas de promastigotas metacíclicas, as formas infetantes para os mamíferos, reiniciando-se o ciclo (Boelaert e Sundar, 2014)

Ciclo de vida da *Leishmania*

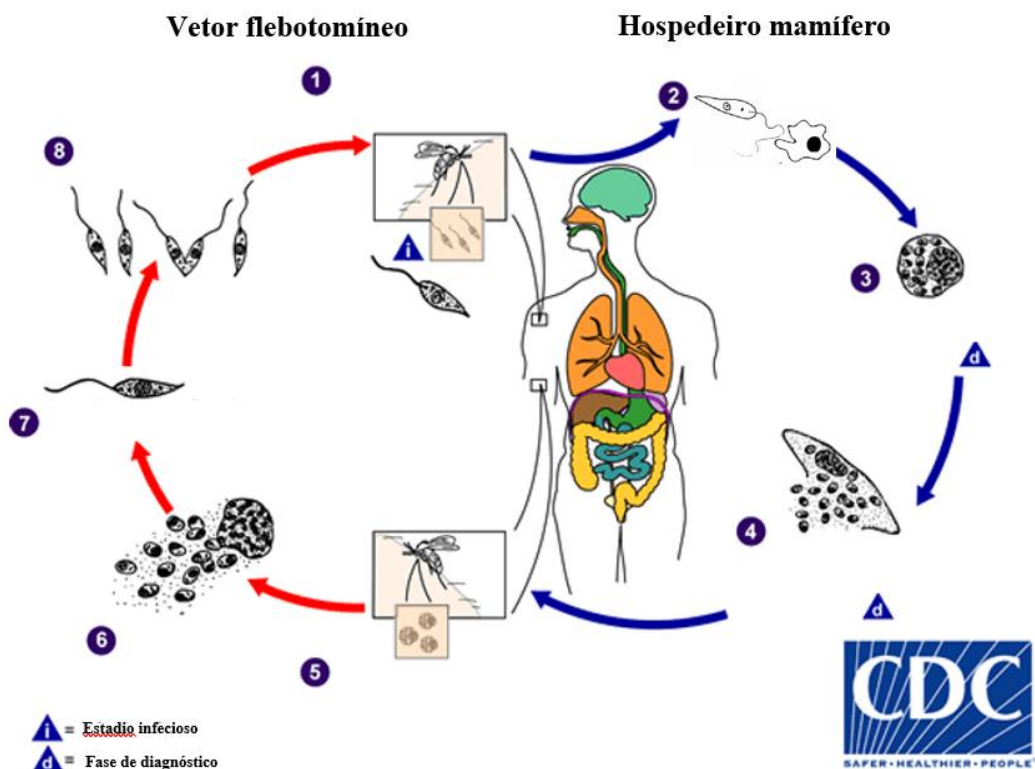


Figura 6: Ciclo biológico da *Leishmania*: 1 - O inseto vetor fêmea infectado inocula as formas promastigotas do parasita na epiderme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo; 2 - Estas formas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário; 3 – os promastigotas transformam-se em formas amastigotas entre 12-24h e começam a multiplicar-se por fissão binária; 4 - rompimento dos macrófagos e infecção de novas células; 5 e 6 - contaminação do vetor com as formas amastigotas durante a refeição sanguínea; 7 e 8 - no sistema digestivo do vetor, ocorre a diferenciação dos amastigotas

em promastigotas transformando-os nas formas promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto. (Adaptado de: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> acesso a 20-03-2018).

Ocasionalmente, os flebotomíneos não estão envolvidos na transmissão. A LV pode ser iniciada diretamente por amastigotas inoculadas na via sanguínea, através de agulhas compartilhadas, transfusão, disseminação transplacentária ou por transplante de órgãos (Morillas-Marquez *et al.*, 2002).

1.2.2. Hospedeiros

Vetor – Hospedeiro invertebrado

A transmissão da leishmaniose é mediada por um vetor flebotomíneo hematófago, pequeno inseto díptero que mede cerca de 1,5 a 3 mm de comprimento (Figura 7), pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae, sendo que os de importância médica e/ou veterinária estão agrupados na subfamília Phlebotominae (Neves *et al.*, 1997; Dantas-Torres *et al.*, 2012). Ambos os sexos dos flebotomíneos necessitam de hidratos de carbono que sugam das plantas, mas apenas as fêmeas necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos (revisto em Alexander, 2000)

Foram descritas cerca de 800 espécies de flebotomíneos e estão agrupados em dois gêneros de acordo com a sua morfologia e a sua distribuição geográfica: *Phlebotomus* (Velho Mundo – aproximadamente 375 espécies) e *Lutzomya* (Novo Mundo – aproximadamente 464 espécies). Encontram-se descritas cerca de 80 espécies ou subespécies de dípteros flebotomíneos como vetores de *Leishmania* (Alexander e Maroli, 2003; Killick-Kendrick, 2002; Lessa *et al.*, 2007; David e Craft, 2009).



Figura 7: Fêmea de *Phlebotomus papatasi*. Fonte:

http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html

Reservatório – Hospedeiro vertebrado

Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos. As infecções mais comuns são maioritariamente zoonoses, tendo como hospedeiros principais canídeos, homem, roedores, tatus e marsupiais (Lainson, 2010).

O risco de adquirir infecção é determinado pelo comportamento local dos flebotomíneos e pela presença de um animal infetado ou de um reservatório humano (Costa *et al.*, 2000).

O tipo de hospedeiro vertebrado presente no ciclo biológico da *Leishmania*, permite caracterizar o perfil epidemiológico, que pode ser de carácter zoonótico, antrozoonótico ou antroponótico. Em ciclos de transmissão zoonótica, os animais são os reservatórios que mantêm e disseminam o parasita *Leishmania*. Em formas antroponóticas, os seres humanos são considerados a única fonte de infecção para o vetor flebotomíneo. A forma antrozoonótica resulta da transmissão do parasita do animal para o vetor e deste para o homem, neste caso considerado hospedeiro ocasional e os animais são os reservatórios da doença. Diversos estudos indicam que o cão doméstico infetado é o principal reservatório de *L. infantum* nos países onde a LCan é endémica, desempenhando um papel fundamental na transmissão do parasita para os seres humanos (Desjeux, 2001; Campino e Maia, 2010; Maia *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2012; López-Céspedes *et al.*, 2012).

1.3. Interação parasita-hospedeiro

Os macrófagos são as células hospedeiras por excelência para a *Leishmania*. Durante o ciclo biológico ocorrem interações entre o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro mamífero que podem levar ao estabelecimento da infecção e determinar o curso da doença.

Os protozoários do género *Leishmania* desenvolveram formas sofisticadas e complexas que lhes permitem escapar a resposta imune inata, levando à infecção e propagação nos macrófagos do hospedeiro mamífero, desencadeando, por parte deste, uma resposta inflamatória essencial para o controle dos parasitas (Isnard *et al.*, 2012; Atayde *et al.*, 2016).

A alteração da sinalização e das funções dos macrófagos ocorre em vários níveis, desde o bloqueio das vias de sinalização, até a degradação de moléculas-chave de sinalização (ex. quinases). Essas modulações de sinalização permitem a inibição ou interferência de muitas funções-chave dos macrófagos, como produção de óxido nítrico (ON), espécies reativas de oxigénio (ROS), produção efetiva de citocinas, e apresentação de antígenos favorecendo o estabelecimento e proliferação da *Leishmania* nos fagolisossomas (Séguin e Descoteaux, 2016).

Destaca-se o papel das glicoproteínas de superfície implicadas na ligação e captação de promastigotas pelas células hospedeiras, além da inibição dos processos proteolíticos de macrófagos: a protease de superfície de GP63 e o lipofosfoglicano (LPG). A GP63 também designada de leishmanolisina ou principal protease de superfície (MSP) da *Leishmania*, é uma metaloprotease de zinco, abundantemente expressa na superfície de promastigotas em todas as espécies de *Leishmania*, e participa na adesão, penetração e sobrevivência do parasita nos macrófagos dos hospedeiros em *L. infatum* e *L. amazonensis* (González-Aseguinolaza *et al.*, 1997; Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Thiakaki *et al.*, 2006; Mauricio *et al.*, 2007; Atayde *et al.*, 2016). LPG promove a sobrevivência intracelular de promastigotas de *L. donovani* inibindo a fusão do fagossoma contendo o parasita com os lisossomas nos macrófagos (Atayde *et al.*, 2016).

Uma melhor compreensão dessa complexa relação parasitária também exigirá levar em consideração fatores genéticos do hospedeiro, bem como a diversidade de espécies e estirpes de *Leishmania* (Séguin e Descoteaux, 2016).

1.4. Diagnóstico laboratorial

De modo geral o diagnóstico da doença começa com o exame clínico dos sintomas e histórico fornecidos pelo paciente. Para o diagnóstico das leishmanioses utilizam-se métodos parasitológicos, serológicos e moleculares, que variam em termos de sensibilidades e especificidades.

Diagnóstico parasitológico

O exame parasitológico é considerado o teste de excelência para o diagnóstico da doença devido à sua alta especificidade (Herwaldt, 1999; Da Silva *et al.*, 2005). Requer a observação microscópica direta das formas amastigotas do parasita em biópsias de pele, aspirados de linfônodo, medula óssea, baço ou fígado (estes últimos mais raramente), corados por Giemsa (Laurenti, 2009; Campino e Maia, 2010). No entanto, a observação microscópica impossibilita a determinação da espécie (Rodriguez *et al.*, 1994).

Para o diagnóstico de LV a sensibilidade varia de acordo com o tipo de amostra analisada. O cultivo de parasitas em meios de cultura axénicos apresenta sensibilidade superior a 90% (Herwaldt, 1999; Da Silva *et al.*, 2005). As culturas são mantidas entre 22 e 28°C e examinadas semanalmente durante 4 semanas para a verificação de promastigotas, quando positivas as culturas são mantidas por passagem semanal para meio fresco. O meio de cultura standard para *Leishmania* é o meio bifásico NNN (Novy-McNeal Nicolle).

Diagnóstico serológico

Os testes serológicos baseiam na detecção da resposta imune humoral específica desenvolvida durante a LV, os quais utilizam diferentes antígenos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e em geral apresentam excelentes níveis de sensibilidade e especificidade. Diversos testes serológicos podem ser utilizados para detecção de anticorpos circulantes, tais como o teste de aglutinação direta (DAT), imunofluorescência indireta (IFI), “Enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA), testes rápidos imunocromatográficos como o rK39 (Kumar *et al.*, 2001).

O DAT é um dos testes mais simples e menos oneroso usado no diagnóstico da leishmaniose, sendo ideal para uso em campo e em laboratório, com sensibilidade de 91 a 100% e especificidade de 72 a 100%. Dispensa a utilização de equipamentos sofisticados e os seus procedimentos são simples (Garcez *et al.*, 1996; Bezuneh *et al.*, 2014). No entanto não tem valor prognóstico, pois não é capaz de diferenciar infecções recentes das infecções passadas, necessita de tempo de incubação relativamente longo de 18h e a necessidade de diluições seriadas do soro (Singh e Sivakumar, 2003).

Dependendo do antígeno empregado a sensibilidade da IFI pode variar entre 90% e 100% e a especificidade, entre 80% a 100%. A especificidade desta técnica, assim como de outras provas serológicas, é prejudicada pela ocorrência de reações cruzadas com doenças, principalmente aquelas causadas por Tripanossomatídeos (Alves *et al.*, 2012).

O ELISA é um teste imunoenzimático utilizado na detecção de anticorpos (método indireto) e antígenos (método direto), seu resultado é expresso quantitativamente, através da leitura de densidade ótica das amostras testadas. A sensibilidade e especificidade do ELISA dependem do antígeno utilizado (Srivastava *et al.*, 2011). Apresenta uma sensibilidade que varia entre 98,8% e 100% e uma especificidade entre 96,5% a 100% (Gomes *et al.*, 2009).

Testes imunocromatográficos são baseados na ligação de anticorpos específicos a antígenos que, após interação, migram por uma superfície, possibilitando a visualização dos resultados. É exemplo o teste rápido rK39 baseado na proteína recombinante rK39, derivada de uma proteína semelhante à cinesina e tem sido usada nas últimas duas décadas para o diagnóstico serológico da LV com boas sensibilidades (Kumar *et al.*, 2001; Maia

et al., 2012). No formato micro ELISA, este teste mostrou uma alta sensibilidade e especificidade (Srivastava *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2012; Reiter-Owona *et al.*, 2016).

A detecção de antígeno é mais específico do que os testes baseados em anticorpos, pois os níveis de antígenos podem ser relacionados a carga parasitária de um indivíduo com LV bem como não se verifica reações cruzadas e os mesmos distinguem infecções presentes de infecções passadas (Chappuis *et al.*, 2007). Este método de diagnóstico pode ser uma alternativa à detecção de anticorpos, particularmente na coinfeção VIH/LV, onde a resposta de anticorpos é muito fraca.

Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é usada para amplificar o DNA do parasita. Os alvos moleculares podem ser nucleares ou cinetoplastideais. Apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade dependendo do alvo molecular selecionado e do número de cópias deste, permitindo a detecção de *Leishmania* em amostras com cargas para muito baixas (Salotra *et al.*, 2001; Fraga *et al.*, 2010). Outras vantagens em relação ao diagnóstico parasitológico é não haver necessidade da esterilidade da amostra e a obtenção do resultado é menos morosa. Dependendo das sequencias iniciadoras utilizadas é possível efetuar a identificação das espécies de *Leishmania* (Guerra *et al.*, 2011). A determinação da espécie é importante pois o tratamento e o prognóstico varia consoante a forma clínica e espécie envolvida (Srivastava *et al.*, 2011; Torpiano e Pace, 2015).

1.5. Fármacos usados no tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses baseia-se principalmente em quatro fármacos: os antimoniais pentavalentes (Glucantime[®] e Pentostam[®]), a pentamidina (Pentam-300[®]), a anfotericina B (AmBisome[®]) e a miltefosina (Milteforan[®]). Além destes, outros fármacos são utilizados, por exemplo Paromomicina e Alopurinol

Antimoniais pentavalentes (Sb^v)

Os antimoniais pentavalentes (Sb^v), em uso há mais de 70 anos, são os medicamentos de primeira linha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose, principalmente por razões económicas (Rath *et al.*, 2003; Miranda, 2017; Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Estão disponíveis no mercado em duas formulações: stibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®).

O mecanismo de ação destes fármacos envolve redução do Sb⁺⁵ para o estado trivalente (Sb⁺³) mediada pelas células do hospedeiro, gerando espécies reativas de oxigénio, de toxicidade elevada para o parasita, promovendo a fragmentação do DNA, a inibição de processos metabólicos e a diminuição da capacidade do parasita para degradar compostos tóxicos (Singh *et al.*, 2012). As primeiras indicações de falhas terapêuticas associadas à seleção para resistências contra antimoniais pentavalentes em linhagens de *Leishmania* foram relatadas em 1997, na província de Bihar, no norte da Índia (Lira *et al.*, 1999).

Anfotericina B

A anfotericina B (AmB) é um antifúngico isolado da bactéria *Streptomyces nodosus* (Yardley e Croft, 2000; Bern *et al.*, 2006). O seu mecanismo de ação seletivo baseia-se na sua afinidade para o ergosterol, um esteroide presente na membrana de *Leishmania*. A anfotericina B interfere na biossíntese de ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana celular e promovendo a morte, tanto em promastigotas como em amastigotas (Ouellette *et al.*, 2004).

A AmB, normalmente considerada um fármaco de segunda linha, tem sido utilizada como fármaco de primeira linha de tratamento de leishmanioses no Bihar (Índia) após a perda da eficácia dos antimoniais devido a desenvolvimento de resistências. Durante a década de 1980 foram desenvolvidas várias formulações lipídicas de AmB para tratamento de micoses sistémicas em pacientes imunocomprometidos, que demonstraram também eficácia no tratamento da LV, de entre as quais a formulação lipossómica AmBisome®, que veio a ser assumida como tratamento padrão, com eficácia superior a 95%, sendo consideravelmente menos tóxica que a AmB convencional. Todavia, o

elevado custo limita a sua utilização (Yardley e Croft, 2000; Singh *et al.*, 2012; Wijnant *et al.*, 2018). Apesar de a AmB estar em uso desde a década de 60, a perda de eficácia por resistência é ainda baixa (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

Atualmente a AmB lipossômica é considerada a primeira escolha para o tratamento da LV na Europa (WHO, 2017a).

Pentamidina

A pentamidina é uma poliamina utilizada em casos de leishmanioses que não respondem aos antimoniais ou no tratamento de doentes com LV que sejam hipersensíveis ao antimônio. A elevada toxicidade deste fármaco é um fator limitante para o seu uso: casos de hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina, foram descritas como estando associadas a terapêuticas de leishmanioses baseadas em pentamidina (Berman, 1988; Piscopo *et al.*, 2007).

A pentamidina interfere na síntese de DNA, modificando a morfologia do cinetoplasto, e promove a fragmentação da membrana mitocondrial do parasita (Wilson *et al.*, 2008). Casos de resistência à pentamidina também têm sido relatados (Bray *et al.*, 2003).

Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), um fármaco antineoplásico, foi o primeiro medicamento oral aprovado para uso no tratamento da LV (Olliaro *et al.*, 2005). É potencialmente teratogénica, não devendo ser utilizada por mulheres grávidas ou com potencial para engravidar (Davidson, 2017).

Tem uma meia-vida de eliminação de aproximadamente 152 horas, o que garante níveis sub-terapêuticos remanescentes por algumas semanas após um tratamento, podendo potenciar o desenvolvimento de resistências nas regiões onde é extensivamente usada (Sundar e Olliaro, 2007; Singh *et al.*, 2012; Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Embora se conheçam poucos isolados clínicos resistentes à miltefosina, ensaios “in vitro” demonstraram a existência de promastigotas resistentes (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

Paromomicina

A paromomicina (aminosidina) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos. Este fármaco é barato e revelou-se eficaz no tratamento da LV, apresentando contudo pouca eficácia contra LC ou LMC (Davidson, 2017). As observações de toxicidade renal são raras, contudo alguns pacientes podem desenvolver hepatotoxicidade, que se revela pela elevação das concentrações de enzimas hepáticas. Está disponível uma formulação tópica de paromomicina para o tratamento de LC (WHO, 2010).

Alopurinol

O alopurinol é um análogo da purina e um fármaco anti-oxidante, usado no tratamento de várias doenças, algumas resultantes de infeções por protozoários (Simsek *et al.*, 2018). É o principal fármaco recomendado pela Organização Mundial da Saúde para o tratamento prolongado da leishmaniose canina, em regime de monoterapia ou em associação com outros fármacos (Yasur-Landau *et al.*, 2016, 2017). Evidencia baixa toxicidade, porém há registos de diversos casos em que o alopurinol não revelou eficácia no controlo da infeção por *Leishmania* (Yasur-Landau *et al.*, 2016).

1.6. Desenvolvimento de novos fármacos para tratamento das leishmanioses

Derivados de artemisinina

A artemisinina (ART) é uma lactona sesquiterpénica pertencente à classe farmacológica dos endoperóxidos, isolada da planta *Artemisia annua*, na China, nos anos 70 do século XX, por Youyou Tu, (Su e Miller, 2015) e estudos de relação estrutura-atividade realizados posteriormente demonstraram que o farmacóforo é a ponte peroxídica, essencial para a atividade antiparasítica deste fármaco. (Kumar *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2014). A artemisinina tem sido extensivamente utilizada no tratamento da malária desde o final do século XX. A fim de melhorar as propriedades farmacológicas da ART, foram preparados vários derivados semi-sintéticos, entre os quais a dihidroartemisinina (DHA) (metabolito ativo em todos os derivados da artemisinina), o

arteméter, a artemisona e o artesunato, todos eles contendo um grupo peróxido, essencial para a atividade farmacológica (Balint, 2001).

Endoperóxidos sintéticos

A elevada eficácia da artemisinina suscitou a síntese e desenvolvimento de novos peróxidos. Um exemplo são os trioxolanos, também conhecidos como ozonídeos secundários, e os tetraoxanos. Estas classes químicas originaram moléculas bastante promissoras, algumas das quais alcançaram a fase de testes clínicos para tratamento da malária (Kumar *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2014). As vantagens destes compostos sintéticos sobre a artemisinina e seus derivados são maior disponibilidade, menor custo, maior estabilidade metabólica do farmacóforo e menor toxicidade (Vennerstrom *et al.*, 2004; Opsenica e Šolaja, 2009). Vários estudos têm mostrado que os compostos derivados da artemisina são ativos contra parasitas como *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma gondii* (Cortes *et al.*, 2015; Lobo *et al.*, 2016, 2018; Loo *et al.*, 2017). Trabalhos preliminares sobre a suscetibilidade de *L. donovani* a derivados de artemisinina, realizados por Chollet *et al.* (2008) mostraram que um dos compostos (BB 201) amino derivativo revelou atividade contra os promastigotas com CI50 de 1µM, mas sem atividade nos amastigotas intramacrofágicos. Mais recentemente, Cortes *et al.* (2015) mostraram que a dihidroartemisinina (DHA), o artesunato (ART) e dois trioxolanos, LC50 e LC95, inibem a proliferação de *Leishmania spp in vitro*, tendo os peróxidos sintéticos apresentado os melhores perfis de segurança, com atividade em concentrações micromolares baixas.

1.7. Estudos “in vitro”

Leishmania tem um ciclo de vida complexo, em que a forma clínica relevante - amastigota - se encontra no interior dos macrófagos do hospedeiro mamífero e aí se multiplica, aumentando o desafio de acesso dos fármacos aos alvos parasitários. Devido à inexistência de vacinas eficazes para a leishmaniose humana (Miranda, 2017), a quimioterapia continua a ser o melhor meio disponível para tratar a doença, apesar de limitada, onerosa e dos efeitos colaterais que pode causar (Das *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas tem-se observado, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, uma busca crescente de novas opções terapêuticas contra a leishmaniose que sejam de fácil administração (preferencialmente por via oral), seletivas e com elevado índice terapêutico, sendo ainda capazes de ativar adequadamente o sistema imune do hospedeiro infectado.

Um dos importantes passos do processo de descoberta de fármacos é pesquisar e selecionar o alvo terapêutico. A exploração das diferenças metabólicas e bioquímicas entre o parasita e a célula do hospedeiro mamífero, bem como o conhecimento da biologia e do genoma de *Leishmania*, constituem importantes ferramentas na identificação dos alvos para o desenvolvimento de potenciais novos fármacos contra a leishmaniose (Das *et al.*, 2013).

Os amastigotas intracelulares de *Leishmania* são as formas relevantes na infecção do hospedeiro vertebrado. Este é considerado o modelo de referência para o rastreamento *in vitro* de compostos (Cos *et al.*, 2006). Embora métodos de alta produtividade, como o uso de genes repórteres e citometria de fluxo (Kamau *et al.*, 2001; Bolhassani *et al.*, 2011) estejam disponíveis para a triagem de fármacos anti-*Leishmania*, a contagem por microscopia usando coloração de Giemsa continua a ser o método mais comum para avaliação do efeito dos produtos químicos no modelo de amastigotas intracelulares. Estes simulam o ambiente encontrado *in vivo* e fornecem informações essenciais acerca da suscetibilidade ao fármaco, uma vez que incluem os efeitos mediados pelas células hospedeiras (Maia *et al.*, 2007; Sereno *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009). A utilização de linhas celulares é uma alternativa ao uso dos macrófagos peritoniais de ratinhos (Maia *et al.*, 2007).

Apesar de sua importância, este método é muito demorado e, por isso, muitos ensaios *in vitro* usam métodos colorimétricos (por exemplo, Alamar blue, MTT, XTT) para testar um grande número de amostras envolvidas na triagem de compostos para avaliar a suscetibilidade de promastigotas de *Leishmania* (extracelulares) e amastigotas axênicos em cultura (Cos *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2015). As formas promastigotas são facilmente cultiváveis em meios de cultura com pH neutro a 25-27°C e, portanto, as mais utilizadas.

No entanto, os resultados dos testes do sistema *in vitro* precisam de ser avaliados em modelos animais, no sentido de se avaliar, entre outros, a tolerância e eficácia dos compostos (Gupta e Nishi, 2011).

A atividade do fármaco pode ser analisada através da avaliação da viabilidade da população celular utilizando os métodos colorimétricos (MTT, XTT, MTS ou WST-1), determinação da atividade da ornitina descarboxilase (alterações de pH), utilização de nucleótidos radioativos (Serenó *et al.*, 2007; Gupta e Nishi, 2011).

O método colorimétrico de MTT [brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazólio], inicialmente descrito por Mosmann em 1983, (Itagaki *et al.*, 1998), é uma alternativa útil aos métodos radioisotópicos que permite avaliar a viabilidade celular. As principais vantagens são: sensibilidade e reprodutibilidade, eliminação da necessidade de compostos radioativos, facilidade com a qual pode ser realizada e quantificado e rapidez (Ferrari *et al.*, 1990). Baseia-se na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou *Thiazolyl blue* (MTT). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido num *formazan* púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais dos parasitas ou células viáveis.

O substrato de MTT é preparado usualmente numa concentração final de 2 - 5mg/mL em PBS, sendo a solução adicionada às células em cultura e incubado por 1 a 4 horas. A quantidade de sais de *formazan* é medida após a sua solubilização com DMSO, efetuando-se a medição da absorvância a 570 nm, utilizando um espectrofotómetro de leitura de placas. Uma alternativa ao MTT é o XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolil-5-carboxanilida) em que os sais de *formazan* são solúveis em água, evitando o passo de solubilização.

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os estudos abordados nesta tese foram realizados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Universidade Nova de Lisboa), no laboratório de Leishmanioses, com a estreita colaboração da Prof.^a Doutora M^a de Lurdes Cristiano da Faculdade de Ciências e Tecnologia - Departamento de Química – Universidade do Algarve, química responsável pela disponibilização dos peróxidos (trioxolanos e tetraoxanos) usados nos ensaios descritos nesta tese. A síntese dos endoperóxidos disponibilizados para os testes e dos compostos intermédios necessários à sua preparação foi efetuada pelo grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal do Centro de Ciências do Mar do Algarve, com o envolvimento das mestres Lília Isabel Lameirinhas Cabral e Patrícia Sofia Menalha Amado (<https://www.ccmr.ualg.pt/en/group/organic-reactivity-and-medicinal-chemistry>).

2.1. Parasitas *Leishmania*

Nos ensaios utilizaram-se promastigotas de três espécies de *Leishmania*: *Leishmania infantum* (MHOM/PT/88/IMT151), *Leishmania donovani* (MHOM/BD/2006/BD14) e *Leishmania tropica* (MHOM/PS/2002/63jnF21). Após descongelamento, os parasitas foram cultivados em frascos de cultura contendo meio líquido M199 (Sigma), suplementado com 20% de soro fetal bovino (FCS, Biochrom), Penicilina/Estreptomicina (Sigma), 10.000UI/mL Pen + 10mg/mL Strep e L-glutamina (Sigma), 200mM. As culturas foram incubadas a 26°C ±1°C, procedendo-se à mudança do meio de cultura a cada 5-6 dias. Todo o processamento de culturas foi efetuado em ambiente estéril, em câmara de fluxo laminar.

A densidade dos parasitas em suspensão foi determinada pela contagem das formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer ou hemocítmetro, nas câmaras de contagem inferior e superior, ao microscópio, numa ampliação de 400x (Figura 8).

Para o cálculo da concentração de parasitas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{Parasitas}] = \frac{(C1 + C2)}{2} \times \text{fator de diluição} \times 50 \times 10^3 \text{ promastigotas/mL}$$

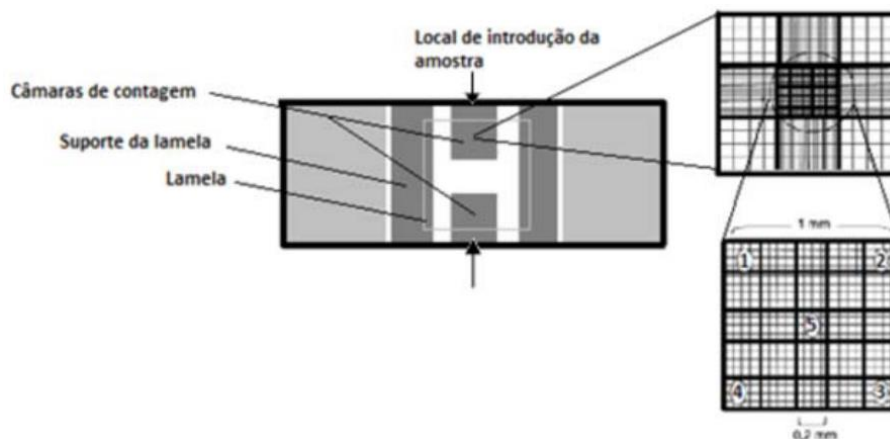


Figura 8: Representação esquemática da câmara de Neubauer (Adaptado de: IDRC, n.d.). 1-5, esquadrias em que foi efetuada a contagem dos promastigotas.

2.2. Manutenção das culturas celulares

A linha celular aderente macrofágica J774.A1 (ATCC® TIB-67™) e a linha celular de suspensão monocítica THP-1 (ATCC® TIB-202™) foram mantidas no laboratório em meios de cultura DMEN e RPMI, respetivamente, suplementados com 10% de FCS, Penicilina/Estreptomicina (Sigma), 10.000UI/mL Pen + 10mg/mL Strep e L-glutamina (Sigma), 200mM, em frascos de culturas de células de 25 cm², a 37°C ±1°C em atmosfera húmida, com 5% CO₂, com meio renovado e repique de 3 a 4 dias.

Para a quantificação celular, pipetou-se 50 µL de cultura celular previamente homogeneizada para um tubo de plástico com 10 ml da solução de diluição “easy toner”, procedendo-se à determinação da concentração celular no contador de células CASY Counter. Ajustou-se a concentração da linha celular desejada 5 x 10⁵ células/mL (para a determinação da citotoxicidade) ou 2,5 x 10⁵ células/mL (infecção macrofágica) centrifugando a 1200 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sedimento foi posteriormente ressuspensionado no meio de cultura, RPMI para a linha THP-1 e DMEM para a linha J774.A1.

2.3. Preparação dos compostos

Os trioxolanos e tetraoxanos testados no decorrer deste trabalho foram sintetizados no grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, com o envolvimento das mestres Lília Isabel Lameirinhas Cabral e Patrícia Sofia Menalha Amado, e foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Doutora Maria de Lurdes Cristiano, para que fossem testadas as suas atividades anti-*Leishmania in vitro* (Anexo A).

Procedeu-se à solubilização dos compostos em DMSO para preparação da solução “stock”, tendo em atenção que na solução final a testar a concentração de DMSO não poderá exceder 1%, devido à toxicidade deste solvente (Cos *et al.*, 2006). Para os diferentes ensaios efetuaram-se diversas diluições de cada composto, num máximo de seis diluições seriadas, preparadas nos respetivos meios suplementados (M199 para promastigotas, RPMI para a linha THP-1 e DMEM para a linha J774.A1) (Anexo B).

Como controlos positivos, foram utilizados três fármacos de referência para o tratamento da leishmaniose: anfotericina B, miltefosina e pentamidina.

2.4. Avaliação da citotoxicidade dos compostos

A avaliação da citotoxicidade dos compostos selecionados foi feita nas linhas celulares J774.A1 e THP-1.

Efetuuou-se a quantificação da linha celular J774.A1 e procedeu-se ao ajuste das concentrações para 5×10^5 células/mL (descrita no ponto 2.2). Após homogeneização da cultura de células, colocou-se 100 µL/poço da suspensão celular em placas de 96 poços de fundo plano, adicionou-se 100 µL/poço das diferentes concentrações dos compostos e incubou-se por 48h.

Após 48 horas de incubação, adicionou-se 20 µL da solução de trabalho MTT (5 mg/mL) em cada poço e voltou-se a incubar a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com 5% CO_2 , durante 4 horas, protegido da luz, para determinação da viabilidade celular através da atividade mitocondrial. Em seguida a placa foi centrifugada a 3000 rpm por 30 min e descartou-se o sobrenadante (por aspiração a vácuo) adicionando-se 150 µL de DMSO para

solubilização dos cristais de *formazan*. As absorvâncias foram lidas no espectrofotômetro (TRIAD Multimode Detector, DYNEX Technologies) no comprimento de onda de 595 nm. Os dados obtidos foram tratados usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), o que permite estabelecer uma relação dose-resposta com análise de regressão não linear com “slope” variável e estimar as concentrações que inibem 50% das células (CC50).

No caso da THP-1, uma vez que é uma linha celular monocítica, há a necessidade de efetuar inicialmente a diferenciação destas células em macrófagos aderentes para os ensaios de citotoxicidade e infecção com os promastigotas (Daigneault *et al.*, 2010). Efetuou-se a quantificação da linha celular THP-1 e procedeu-se ao ajuste das concentrações para 5×10^5 células/mL (descrita no ponto 2.2).

Após centrifugação, o sedimento foi ressuscitado em RPMI com 100 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) por forma a induzir a diferenciação em macrófagos com uma incubação de 24h a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sob uma atmosfera de 5% de CO_2 .

Seguidamente incubou-se com as diferentes concentrações dos compostos, procedendo como descrito para a J774.A1. Para garantir maior reprodutibilidade analítica, foram efetuados três ensaios independentes, com quatro replicados para cada concentração.

2.5. Efeito dos compostos nos promastigotas

Os endoperóxidos foram testados em termos do seu efeito nas formas promastigotas, em comparação com os fármacos controlo e com parasitas não tratados.

As culturas de promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica* em fase estacionária de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo plano (VWR) a uma concentração ajustada para 5×10^6 promastigotas/mL num volume total necessário para o número de compostos/placas. Cada composto foi adicionado em concentrações decrescentes (Anexo B). Colocou-se em volta da placa uma tira de parafilm para controlo da evaporação e incubou-se a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 horas.

Após as 48 horas, a atividade inibitória dos compostos foi avaliada usando o método MTT (como descrito em 2.4). A leitura das absorvâncias foi efetuada num espectrofotômetro e os dados foram tratados usando o programa GraphPad Prism 5.0 procedendo-se ao cálculo das concentrações inibitórias para 50% dos parasitas CI50, como descrito anteriormente.

Para garantir maior reprodutibilidade analítica, foram efetuados três ensaios independentes, com quatro replicados para cada concentração.

2.6. Efeito dos compostos no sistema macrófago-amastigota

Foi realizado um ensaio de suscetibilidade *in vitro* em amastigotas intracelulares de *L. donovani* e *L. infantum*, após a infecção das células macrofágicas J777.A1 com promastigotas em fase estacionária.

Após a quantificação da concentração celular, como descrito em 2.2, procedeu-se ao ajuste das concentrações para $2,5 \times 10^5$ células/mL, centrifugando a 1200 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sedimento foi posteriormente ressuspendido em DMEM suplementado. Após homogeneização da cultura de células, colocou-se 200 μ L/poço da suspensão celular em lâminas de vidro de cultura Lab Tek de 16 poços (Nunc), a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, sob uma atmosfera de 5% de CO_2 , durante 3 horas, para possibilitar a aderência das células na lâmina.

Terminado o período de incubação foi então efetuada uma lavagem com DMEM para remover as células não aderentes. As células macrofágicas foram infetadas com promastigotas das duas espécies de *Leishmania* numa concentração de $2,5 \times 10^6$ par/mL (200 μ L/poço), numa razão de 1:10 (macrófago:parasitas) e mantidas sob as mesmas condições durante 24h. Após 24h, foram efetuadas duas lavagens com DMEM, as células foram incubadas com 200 μ L/poço das diferentes diluições dos compostos (Anexo B) e incubadas por mais 48h nas mesmas condições de temperatura e CO_2 . Para controlos negativos foram usadas culturas não tratadas. Quando o período de tratamento terminou, os macrófagos foram cuidadosamente lavados com PBS 1X, as lâminas foram secas ao

ar, fixas com metanol e coradas com Giemsa (1 gota/mL de água destilada, durante 12 minutos).

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico numa ampliação de 1000x, tendo-se determinado as taxas de infecção para cada espécie de *Leishmania* (nº de macrófagos infetados em cada 100 macrófagos contados aleatoriamente) e a intensidade de infecção (nº de parasitas por macrófago em cada 100 macrófagos contados aleatoriamente). Os macrófagos foram considerados infetados com pelo menos um amastigota no seu interior.

Foram efetuados 2 replicados por cada concentração. Os valores de CI50 foram determinados com recurso ao programa GraphPad Prism 5.0, como descrito anteriormente.

2.7. Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) exprime a relação entre a citotoxicidade do composto para células de mamíferos e sua atividade microbicida, refletindo assim a sua eficácia. Segundo Chiaradia *et al.* (2007), para que um composto possa ser considerado protótipo de um novo fármaco o seu índice de seletividade tem de ser maior ou igual a 10. Outros autores consideram que um composto deve ter um valor de $IS > 20$ para ser considerado ativo contra *Leishmania* (Nwaka *et al.*, 2011).

Para avaliar a eficácia dos compostos estudados contra as diferentes espécies de *Leishmania*, foi calculado IS da seguinte forma:

$$IS = CC50 / CI50$$

Onde o numerador representa a concentração de um composto necessária para inibição *in vitro* de 50% de macrófagos de THP-1 ou J774.A1 e o denominador representa a concentração do mesmo composto necessária para inibição *in vitro* de 50% de parasitas de *Leishmania* (promastigotas ou amastigotas).

2.8. Integridade do DNA dos promastigotas

O seguinte ensaio pretendeu avaliar se os compostos induziram a fragmentação do DNA das formas de promastigotas de *L. infantum* e *L. donovani*.

As formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (1×10^7 parasitas/mL) foram incubadas com os compostos mais ativos, nas concentrações de CI50 correspondentes, bem como com o fármaco de referência AmB, na sua concentração CI50, e incubados durante 48h, a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Para controlo negativo utilizaram-se parasitas não tratados.

Terminado o período de incubação, os parasitas foram centrifugados a 3800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e fez-se uma lavagem com 1mL PBS 1X nas mesmas condições. Removeu-se o sobrenadante e procedeu-se à extração do DNA.

O sedimento foi ressuscitado em 150 μL de tampão de extração TELT (50mM TRIS pH8 + 62,5mM EDTA pH9 + 2,5M LiCl + 4% Triton X-100). Adicionou-se 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinase K (20 mg/mL) e incubou-se por 5 minutos com leve agitação manual. Adicionou-se 150 μL de fenol/clorofórmio, invertendo durante 5 minutos (manualmente). Centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo. Adicionou-se 300 μL de etanol 100% gelado e incubou-se à temperatura ambiente durante 20 minutos, para precipitação do DNA. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos e descartou-se o sobrenadante (por inversão). Lavou-se o *pellet* com 1mL de etanol 70% e centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Secou-se o sedimento em estufa a 37° durante aprox. 2h e ressuscitou-se cuidadosamente em 50 μL de água bi-destilada.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop.

Para confirmar a presença do material genético e a sua integridade após incubação com os compostos, aplicou-se 150-200ng da amostra de DNA num gel de agarose a 2%. Efetuou-se a eletroforese numa tina com TAE 1X (Nzytech) a 100V durante 90 minutos.

A visualização do DNA genômico de *Leishmania* no gel efetuou-se sob iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografado.

2.9. Análise morfométrica das formas promastigotas em microscopia ótica

Para os compostos mais ativos na infecção macrófago-amastigota efetuaram-se esfregaços de promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica (1×10^7 células/mL) sujeitos aos CI50 de cada um dos compostos, para análise morfométrica dos parasitas. Os parasitas foram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa (Sigma), efetuando-se as medições do comprimento e largura do corpo e comprimento do flagelo em microscópio ótico (Eclipse80, Nikon), com uma ampliação de 1000X. Para cada condição foram efetuadas pelo menos 30 contagens independentes, com recurso ao programa de imagem NIS – Elements BR (Nikon).

2.10. Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como valores médios \pm desvio padrão. O significado estatístico dos CI50 dos compostos na infecção intra-macrofágica e a análise morfométrica dos parasitas foi avaliado por análise de variância (ANOVA) unidirecional, com recurso ao GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações foram efetuadas para determinar quais os compostos estatisticamente diferentes, utilizando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos nas linhas celulares THP-1 e J774.A1

Vários estudos têm utilizado diferentes linhas celulares no sentido de avaliar a citotoxicidade de diferentes compostos (Lemaire *et al.*, 2014). Maia *et al.* (2007) efetuou um estudo utilizando diferentes tipos de macrófagos no sentido de avaliar as taxas de infecção com *Leishmania*. A linha celular THP-1 tem sido considerada como adequada para os ensaios de infecção macrofágica (Jain *et al.*, 2012).

Neste estudo avaliou-se a citotoxicidade de uma biblioteca de endoperóxidos, derivados de artemisina e de origem sintética, em duas linhas celulares monocíticas/macrofágicas, conforme descrito em 2.4.

No geral os compostos evidenciaram baixa citotoxicidade em ambas as linhas, embora com valores de CC50 superiores aos observados para os compostos controle usados no estudo. Contudo houve diferenças de CC50 para as duas linhas celulares, independentemente dos compostos avaliados (Tabela 2). A linha celular macrofágica murina J774.A1 revelou-se mais suscetível que a THP-1, uma vez que a maioria dos compostos apresentou menores valores de CC50 naquela linha. Este comportamento de baixa citotoxicidade em relação às THP-1 foi também verificado em estudos realizados por Cortes *et al.* (2015). Neste estudo, os trioxolanos, LC95 e LC50 apresentaram os melhores perfis de atividade e segurança, exibindo atividade anti-*Leishmania* elevada e baixa toxicidade em células hospedeiras, quando comparados com os fármacos usados como controle (Cortes *et al.*, 2015). Relativamente a estes, verificou-se que o fármaco mais citotóxico foi a pentamidina ($0,20 \pm 0,09 \mu\text{M}$ e $2,01 \pm 0,37 \mu\text{M}$).

Tabela 2: Valores de concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC50), nas linhagens J774.A1 e THP-1, após 48 h de tratamento.

Compostos	Citotoxicidade	
	CC50 ± DP (µM)	
	Linha celular J774.A1	Linha celular THP-1
Anfotericina B	71,87 ± 5,39	23,20 ± 2,96
Miltefosina	94,40 ± 17,25	100,35 ± 12,14
Pentamidina	0,20 ± 0,09	2,01 ± 0,37
LC50	519,25 ± 139,52	712,80 ± 18,38
LC93	12,00 ± 0,53	184,89 ± 16,08
LC129	323,35 ± 24,46	355,85 ± 31,39
LC131	34,13 ± 14,52	78,17 ± 14,14
LC132	45,82 ± 19,86	99,78 ± 16,4
LC136	113,03 ± 13,77	250,47 ± 4,11
LC137	443,18 ± 44,01	3569,26 ± 0,00
LC138	527,93 ± 54,00	2839,38 ± 0,00
LC139	912,88 ± 70,66	115,19 ± 11,4
LC140	677,55 ± 29,94	3399,63 ± 0,00
LC146	1464,96 ± 134,11	3223,93 ± 0,00
LC163	474,32 ± 83,51	2753,38 ± 0,00
DHA	283,35 ± 37,77	125,92 ± 28,97
D-DHA	631,76 ± 70,24	*
ATS	190,14 ± 51,17	304,35 ± 34,87
D-ATS	391,94 ± 48,74	916,62 ± 80,61

CC, concentração citotóxica; DP, desvio padrão; * não determinado; DHA, Di-hidroartemisinina; D-DHA, Di-hidroartemisinina desoxigenada; ATS, Artesunato; D-ATS, Artesunato desoxigenado.

Há que ter em conta que ambas as linhas celulares têm diferentes origens, sendo que a THP-1 deriva de células de leucemia monocítica aguda humana, enquanto que a J774.A1 é uma linha murina macrofágica resultante de sarcoma de células reticulares. A sensibilidade intrínseca das células depende de várias características das mesmas, que incluem biotransformação e ligação química, características de permeabilidade da membrana e recetores da superfície e mecanismos adaptativos e de recuperação das células (Ekwall *et al.*, 1990). Para alguns produtos químicos tóxicos, é o estado funcional

da célula e não o tipo de célula que determina a extensão em que a inibição de um determinado mecanismo bioquímico é crítico para o função e sobrevivência da célula.

Em geral, as linhas celulares monocíticas, tais como células monocíticas murinas (J774.A1 e RAW264.7) e humanas (THP-1, U937, HL-60), representam um bom modelo para estudos *in vitro* de novos compostos anti-*Leishmania* (Maia *et al.*, 2007; Vermeersch *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2012; Anand *et al.*, 2017).

3.2. Avaliação da suscetibilidade das formas promastigotas de *Leishmania* aos compostos testados e determinação dos índices de seletividade

Os valores de CI50 foram obtidos a partir de curvas de dose-resposta resultantes dos ensaios de suscetibilidade com as formas promastigotas das estirpes IMT151 – *L. infantum*, BD14 – *L. donovani* e LRL 881 - *L. tropica*, para cada um dos compostos.

No presente estudo foram observadas diferenças significativas quanto à suscetibilidade das diferentes espécies de *Leishmania* a cada composto peroxídico testado (Tabela 3).

De um modo geral, os peróxidos não revelaram uma redução expressiva do número de promastigotas, tendo o peróxido LC132 demonstrado melhor atividade leishmanicida para a *L. infantum* e *L. donovani* (CI50 de 12,96 μM e 14,34 μM , respectivamente), sendo que para a *L. tropica* mostrou uma menor atividade (CI 50 de 135,90 μM).

A suscetibilidade à AmB e pentamidina não diferiu entre *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica*, com CI50 de 0,15 μM ; 0,25 μM ; 0,22 μM e 0,39 μM ; 0,62 μM ; 0,82 μM , respectivamente. Relativamente à miltefosina, *L. infantum* revelou-se muito menos suscetível (CI50 148,73 μM) que as outras espécies (CI50 24,22 μM para *L. donovani* e 9,70 μM para *L. tropica*). Apesar de a AmB e a pentamidina revelarem boa atividade leishmanicida, como seria de esperar, uma vez que fazem parte do arsenal de fármacos atualmente em uso no tratamento da leishmaniose visceral, apresentam efeitos secundários preocupantes (Croft e Olliaro, 2011).

Tabela 3: CC50, CI50 e IS de pentamidina, miltefosina, AmB, trioxolanos e tetraoxanos sintéticos, e derivados de artemisina testados em formas promastigotas de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica* e na linhagem celular J774.A1.

Compostos	Citotoxicidade		Promastigotas/suscetibilidade				
	CC50 ± DP (µM)		IS	CI50 ± DP (µM)			
	J774.A1	<i>L. infantum</i>		<i>L. donovani</i>	IS	<i>L. tropica</i>	IS
Anfotericina B	71,87 ± 5,39	0,15 ± 0,01	467,7	0,25 ± 0,04	282,5	0,22 ± 0,00	332,1
Miltefosina	94,40 ± 17,25	148,73 ± 11,74	0,6	24,22 ± 10,05	3,9	9,70 ± 0,09	9,7
Pentamidina	0,20 ± 0,09	0,39 ± 0,06	0,5	0,62 ± 0,11	0,3	0,82 ± 0,4	0,2
LC50	519,25 ± 139,52	378,91 ± 13,97	1,4	353,58 ± 8,39	1,5	183,64 ± 5,87	2,8
LC93	12,00 ± 0,53	435,02 ± 100,4	0,0	152,94 ± 22,38	0,1	122,69 ± 0,00	0,1
LC129	323,35 ± 24,46	265,93 ± 37,74	1,2	242,41 ± 10,21	1,3	68,50 ± 0,00	4,7
LC131	34,13 ± 14,52	321,14 ± 41,09	0,1	123,46 ± 18,96	0,3	81,99 ± 13,53	0,4
LC132	45,82 ± 19,86	12,96 ± 5,08	3,5	14,34 ± 5,52	3,2	135,90 ± 22,04	0,3
LC136	113,03 ± 13,77	434,24 ± 24,60	0,3	231,80 ± 28,42	0,5	230,59 ± 0,00	0,5
LC137	443,18 ± 44,01	137,05 ± 1,15	3,2	143,31 ± 16,47	3,1	260,13 ± 0,00	1,7
LC138	527,93 ± 54,00	186,57 ± 5,80	2,8	239,60 ± 34,76	2,2	161,77 ± 4,92	3,3
LC139	912,88 ± 70,66	472,32 ± 207,40	1,9	506,83 ± 53,33	1,8	463,79 ± 0,00	2,0
LC140	677,55 ± 29,94	258,20 ± 29,75	2,6	460,08 ± 38,26	1,5	353,90 ± 0,00	1,9
LC146	1464,96 ± 134,11	491,65 ± 98,27	3,0	792,98 ± 37,23	1,8	349,47 ± 0,00	4,2
LC163	474,32 ± 83,51	190,30 ± 78,29	2,5	531,59 ± 105,16	0,9	403,92 ± 0,00	1,2
DHA	283,35 ± 37,77	92,33 ± 15,4	3,1	89,02 ± 17,40	3,2	142,18 ± 27,73	2,0
D-DHA	631,76 ± 70,24	185,07 ± 26,92	3,4	181,60 ± 17,11	3,5	241,43 ± 21,51	2,6
ATS	190,14 ± 51,17	55,02 ± 2,84	3,5	103,10 ± 10,90	1,8	158,12 ± 14,83	1,2
D-ATS	391,94 ± 48,74	187,71 ± 19,11	2,1	306,68 ± 37,29	1,3	261,77 ± 12,17	1,5

CC, concentração citotóxica; DP, desvio padrão; DHA, Di-hidroartemisinina; D-DHA, Di-hidroartemisinina desoxigenada; ATS, Artesunato; D-ATS, Artesunato desoxigenado.

Os compostos desoxigenados D-DHA e D-ATS apresentaram menor potencial leishmanicida, com valores de CI50 superiores (D-DHA - 185,07 µM, 181,6 µM e 241,43 µM e D-ATS – 187,71 µM, 306,68 µM e 261,77 µM para *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* respetivamente) aos dos seus precursores DHA e ATS, respetivamente (DHA – 92,33 µM, 89,02 µM e 142,18 µM e ATS – 55,02 µM, 103,1 µM e 158,12 µM para *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* respetivamente) e, conseqüentemente, menores valores de IS. Este facto poderá indiciar a importância da ponte endoperóxido na atividade leishmanicida, tal como verificado para a atividade antimalárica destes compostos (O'Neill *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2013; Cortes *et al.*, 2015).

3.3. Avaliação do efeito dos compostos no sistema amastigota-macrófago e determinação do índice de seletividade

Para avaliar o potencial leishmanicida dos diferentes compostos testados nas formas amastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* internalizadas em macrófagos J774.A1, após 48h de tratamento, foi feita a contagem em microscópio ótico do número total de macrófagos infectados e do número de amastigotas internalizadas em cada macrófago infectado, num total de 100 (Figura 9). Os valores de CI50, foram calculadas com base nas taxas de infecção para cada concentração, tendo por base o grupo controlo (macrófagos não tratados) com infetividade de 100%.

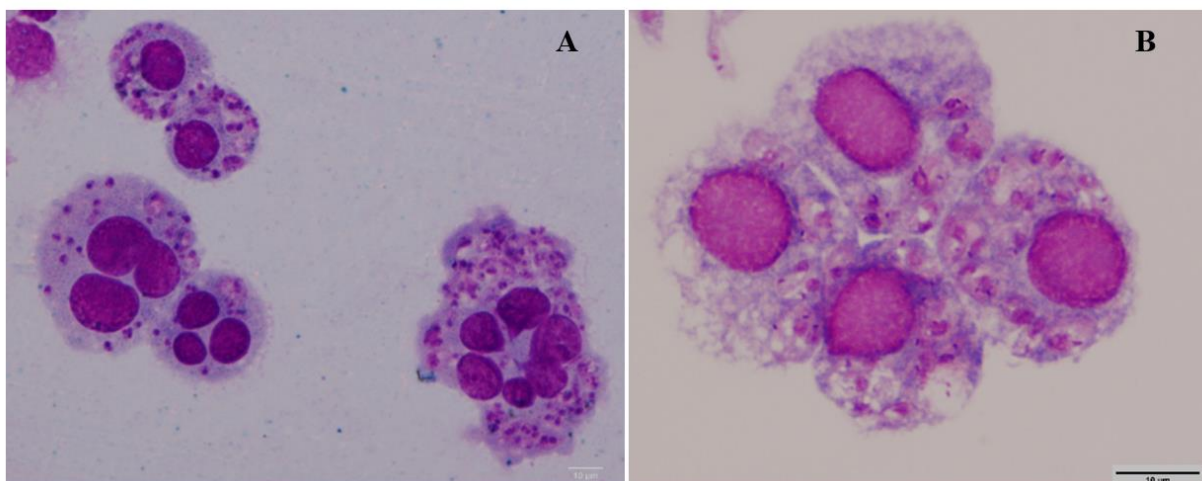


Figura 9: Linha celular J774.A1 infetada com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (A=400x e B=1000x) (Fotos: A. Mendes).

Foram selecionados os compostos que apresentaram CI50 mais baixos em relação às formas promastigotas: LC132, LC137, LC138, DHA, ATS, D-DHA, D-ATS e os compostos controlo.

Em concentrações micromolares, os compostos apresentaram um fraco perfil de atividade, à exceção do tetraoxano LC138 que revelou maior eficácia contra as formas amastigotas de *L. infantum* (Figura 10) e baixa toxicidade para a linha celular J774.A1, com um IS de 22,8, sendo 38 vezes mais seletivo que a pentamidina e 4 vezes mais seletivo que a miltefosina (Tabela 4).

Curiosamente, as espécies *L. infantum* e *L. donovani*, ambas responsáveis pela forma visceral da doença, apresentaram suscetibilidades completamente diferentes relativamente ao LC138. Uma possível justificação poderá ser o grau de resistência genética que a estirpe de *L. donovani* possa ter adquirido. Nós desconhecemos o historial clínico do paciente em que foi feito o isolamento. Infelizmente, devido a contaminação das culturas, foi apenas possível efetuar um ensaio com *L. donovani*, não sendo possível verificar se este comportamento se manteria.

Verificou-se que, na infeção macrófago-amastigota, a AmB revelou elevada atividade em ambas as espécies (CI50 de 0,08 μM) e segurança na linha macrofágica estudada, com ISs de 898,4 μM para *L. infantum* e 908 μM para *L. donovani*.

Segundo Chiaradia *et al.* (2007), um composto promissor deverá apresentar um IS > 10. A análise demonstrou que a maioria dos compostos apresentam uma atividade limitada, apesar de se mostrarem pouco tóxicos para as linhas celulares, o que se reflete num índice de seletividade baixo.

Noutro estudo, verificou-se que, em concentrações micromolares, os trioxolanos LC50 e LC95 apresentaram bons perfis de atividade e de segurança, com IS para as formas amastigota de > 90.08 e 54.82 e para as formas promastigotas > 768.44 e 1684.74, respetivamente (Cortes *et al.*, 2015).

Além de apresentarem resultados promissores quando testados em parasitas de *Leishmania*, os trioxolanos e tetraoxanos têm demonstrado boa atividade antimalárica, tanto *in vitro* como *in vivo* (Marti *et al.*, 2011; Lobo, 2012; Lobo *et al.*, 2018). Nestes estudos os compostos testados apresentaram atividade semelhante ou superior à artemisinina e aos seus análogos semi-sintéticos mais importantes (artesanato (ATN), artemeter (ATM), artemisona, ácido artelínico e DHA), quando testados em *Plasmodium* spp. E, tal como ocorre em *Leishmania*, a ponte endoperóxido 1,2,4- trioxano ou 1,2,4,5-tetraoxano da estrutura química revelou-se essencial para a atividade antimalárica desses compostos (O'Neill, *et al.*, 2010; Marti *et al.*, 2011).

Tabela 4: Valores de CI50 e IS de pentamidina, miltefosina, AmB, trioxolanos e tetraoxanos sintéticos e derivados de artemisina, testados em formas amastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* e na linhagem J774.A1.

Compostos	Citotoxicidade		Amastigotas intracelulares		
	CC50 ± DP (µM)		CI50 ± DP (µM)		
	J774.A1	<i>L. infantum</i>	IS	<i>L. donovani</i>	IS
Anfotericina B	71,87 ± 5,39	0,08 ± 0,05	898,4	0,08 ± 0,02	908,0
Miltefosina	94,40 ± 17,25	16,77 ± 7,84	5,6	13,30 ± 2,99	7,1
Pentamidina	0,20 ± 0,09	0,32 ± 0,10	0,6	0,35 ± 0,14	0,6
LC132	45,82 ± 19,86	13,15 ± 4,85	3,5	9,42 ± 0,14	4,9
LC137	443,18 ± 44,01	168,54 ± 8,93	2,6	186,92 ± 114,2	2,4
LC138	527,93 ± 54,00	23,19 ± 10,65	22,8	425,91 ± 0,00	< 1,2
DHA	283,35 ± 37,77	33,48 ± 10,78	8,5	69,92 ± 0,83	4,1
D-DHA	631,76 ± 70,24	50,36 ± 11,40	12,5	558,97 ± 0,00	< 1,1
ATS	190,14 ± 51,17	71,74 ± 11,40	2,7	52,03 ± 0,00	< 3,7
D-ATS	391,94 ± 48,74	97,90 ± 53,68	4,0	407,14 ± 0,00	< 1,0

CC, concentração citotóxica; DP, desvio padrão; DHA, Di-hidroartemisinina; D-DHA, Di-hidroartemisinina desoxigenada; ATS, Artesunato; D-ATS, Artesunato desoxigenado.

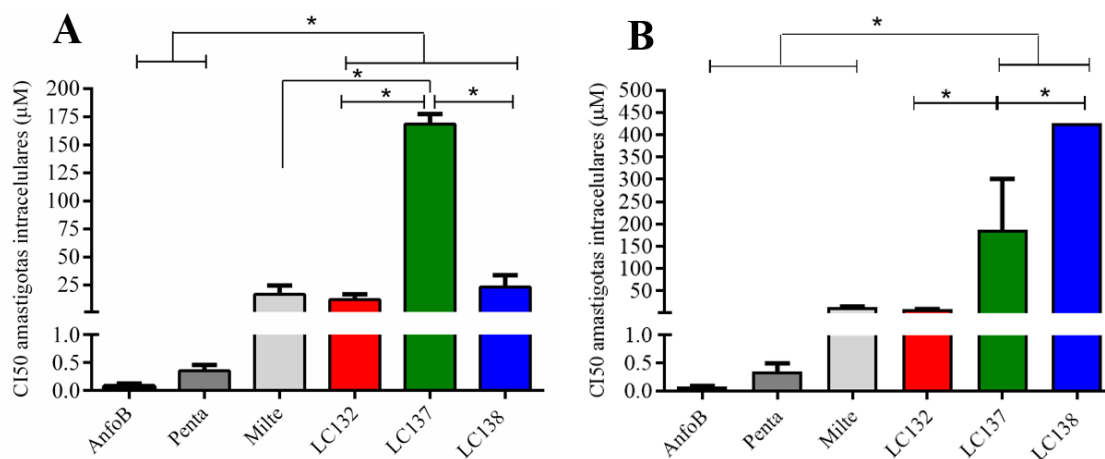


Figura 10: Atividade dos compostos AmB, pentamidina, miltefosina, LC132, LC137 e LC138 em amastigotas intracelulares de *L. infantum* (A) e *L. donovani* (B), após 48 horas de tratamento a diferentes concentrações, na gama micromolar (µM). *, $p < 0,05$.

Os diferentes modelos de infecção utilizados em ensaios influenciam os resultados, que podem assumir diferenças significativas nos valores de atividade de um determinado composto, pois como foi demonstrado *in vitro*, a taxa de infecção difere entre as estirpes e linhas utilizadas (Maia *et al.*, 2007; Da Luz *et al.*, 2009).

Observou-se que, nas mesmas condições de cultura, a estirpe de *L. donovani* BD14 possui maior capacidade de invasão e replicação na célula hospedeira, comparativamente com a estirpe de *L. infantum* IMT 151. Da Luz *et al.* (2009) demonstraram que o processo de metaciclogênese *in vitro* pode variar consideravelmente dependendo da espécie, estirpe e condições de cultura. A transformação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas, que ocorre após a internalização pelo macrófago, pode ser incompleta, influenciando ativamente o resultado do teste de sensibilidade.

Os diferentes valores de CI50 obtidos são refletidos no índice de seletividade, que aumentou para amastigotas intracelulares. As formas amastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* mostraram ser mais suscetíveis para a maioria dos compostos testados, em relação às correspondentes formas promastigotas. Esta suscetibilidade aumentada depende do estágio do parasita, como também é referido por Oliveira (2014) e (Bruno de Sousa *et al.*, 2017, 2018), em que se observou uma maior especificidade de AmB e *Cystoseira* sp em amastigotas do que para o estágio promastigota de *L. infantum*. Porém, estudos realizados por Cortes *et al.* (2015), indicaram o contrário, mostrando que as formas amastigotas são menos suscetíveis que as promastigotas. Essa especificidade depende do estágio do parasita pode estar relacionada com os mecanismos de ação dos fármacos ou com especificidades e formulações dos diferentes compostos. Adicionalmente, a presença do macrófago pode influenciar a efetividade do composto para afetar os parasitas intracelulares.

A utilização de linhas celulares (ex: U937, THP-1, J774.A1, RAW 264.7) para ensaios de infecção e suscetibilidade *in vitro* revela-se vantajosa pois obvia a utilização de grande número de animais para obtenção de macrófagos peritoneais (Maia *et al.*, 2007). Adicionalmente, as linhas celulares são de mais fácil manutenção, garantindo a disponibilidade de uma fonte ilimitada e homogênea de células do hospedeiro.

Para além do modelo macrófago-amastigota, que está mais próximo do sistema biológico do vertebrado na infeção natural e é mais adequado para triagem *in vitro* (Cos *et al.*, 2006; Da Luz *et al.*, 2009; Vermeersch *et al.*, 2009) há que testar posteriormente os compostos mais promissores em modelo animal murino, para avaliação da segurança e tolerância.

3.4. Avaliação da integridade do DNA das formas promastigotas de *Leishmania*

Os resultados obtidos não evidenciaram alteração (fragmentação) no material genético dos parasitas tratados com os diferentes compostos, indicando que estes compostos não parecem atuar ao nível do DNA. Bruno de Sousa *et al.* (2017) observaram que extratos hexânicos de *Cystoseira baccata* não induziram a fragmentação do DNA de *L. infantum*, postulando que o efeito leishmanicida desses compostos pode ser mediado por mecanismos que envolvem outros alvos parasitários.

Estudos anteriores descreveram diferentes vias que induzem morte em *Leishmania* tratadas com diferentes compostos naturais. As alterações ocorrem principalmente a nível da mitocôndria, a principal reguladora dos mecanismos de morte de *Leishmania*, e incluem: alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigénio, condensação e fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina, formação de núcleo picnótico, lipoperoxidação, aumento no número de inclusões lipídicas no citoplasma e organelos vesiculares ácidos (AVOs) (Dutta *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2016; Bruno de Sousa *et al.*, 2017; Shadab *et al.*, 2017).

Tal como ocorre nos outros Tripanossomatídeos, as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* apresentam uma única mitocôndria (Coombs *et al.*, 1986), com a principal função de gerar a energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP), a partir da oxidação de hidratos de carbono, pelo que a mitocôndria vem sendo estudada como potencial alvo para o desenvolvimento de novos fármacos (Lage *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2016).

3.5. Alterações morfológicas das formas promastigotas

O efeito dos compostos mais ativos (LC132, LC137, LC138) na morfologia, em promastigotas de *L. infantum*, foi avaliado por microscopia ótica. A análise morfométrica revelou algumas alterações na forma dos parasitas, nomeadamente no tamanho do corpo e do flagelo.

Os parasitas de controle apresentaram uma forma normal, com flagelos longos, e tanto o cinetoplasto quanto o núcleo apresentaram-se bem diferenciados (Figura 11).

As alterações mais significativas ocorreram em formas promastigotas submetidas ao endoperóxido LC132, na concentração equivalente ao valor de CI50 do composto, que induziu mudanças consideráveis na morfologia dos parasitas, ao nível do comprimento e largura do corpo e do comprimento do flagelo, com desorganização do conteúdo citoplasmático (Figuras 11, 12). O endoperóxido LC137 causou alterações morfológicas semelhantes às induzidas pelo composto LC132.

Além das alterações morfológicas aqui observadas, quando comparados com células controle, outras alterações em parasitas de *Leishmania* submetidos a diversos compostos têm sido demonstrados em diversos estudos, nomeadamente: perda de motilidade, irregularidade do contorno da célula, formas celulares arredondadas anormais, aumento do núcleo, citoplasma vacuolado com ligeira alteração da densidade, redução no padrão de emissão de fluorescência (Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2011; Galiana-Roselló *et al.*, 2013; Oliveira, 2014; Bruno de Sousa *et al.*, 2017, 2018).

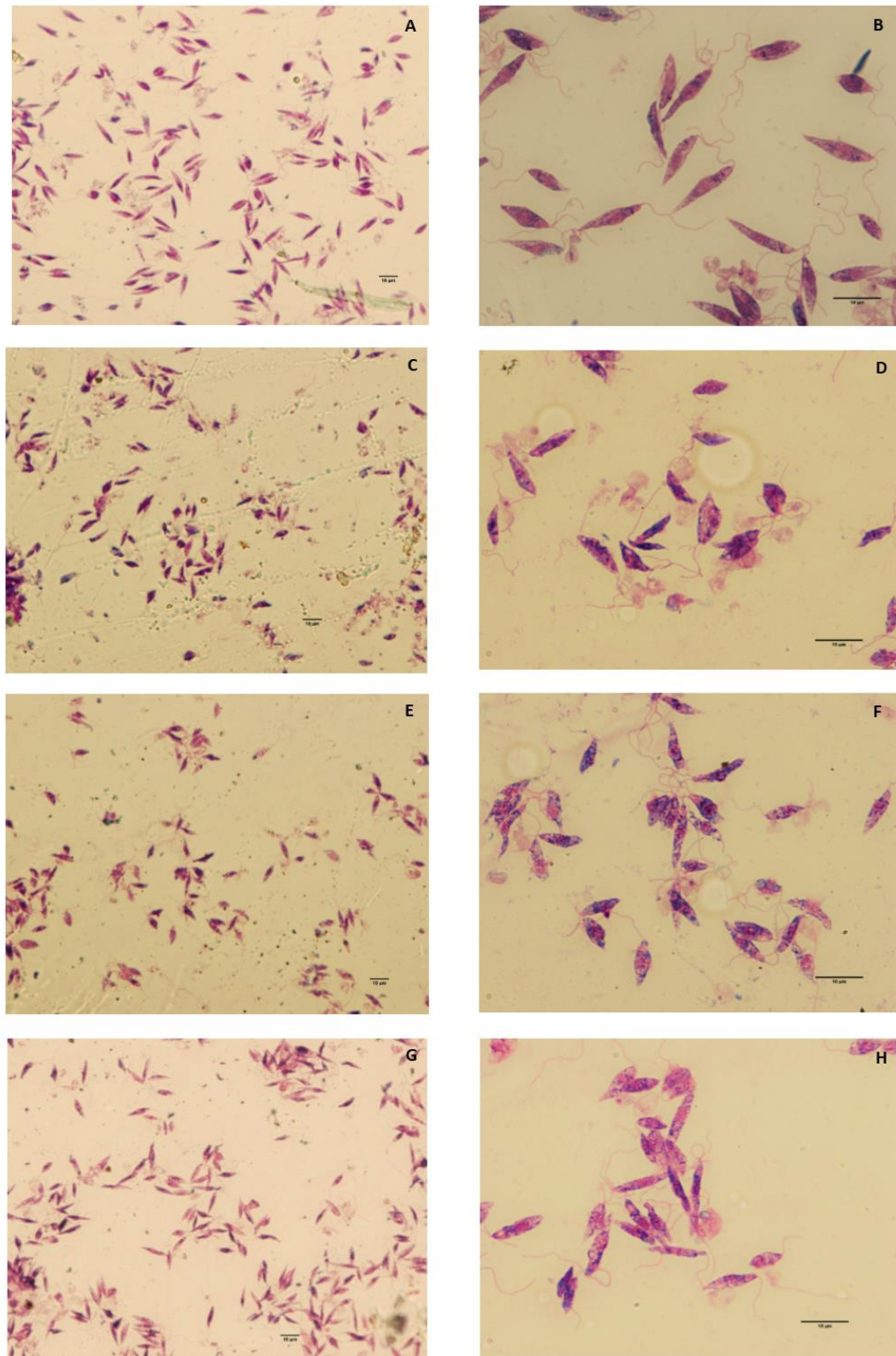


Figura 11: Alterações morfológicas induzidas nos promastigotas de *L. infantum* pelo tratamento *in vitro* com os endoperóxidos, após 48h. Promastigotas não tratados (A e B); tratados com LC132 na concentração de 12,96 µM (C e D); tratados com LC137 na concentração de 137,05 µM (E e F); e LC138 na concentração de 186,57 µM (G e H) (Fotos: S. Cortes).

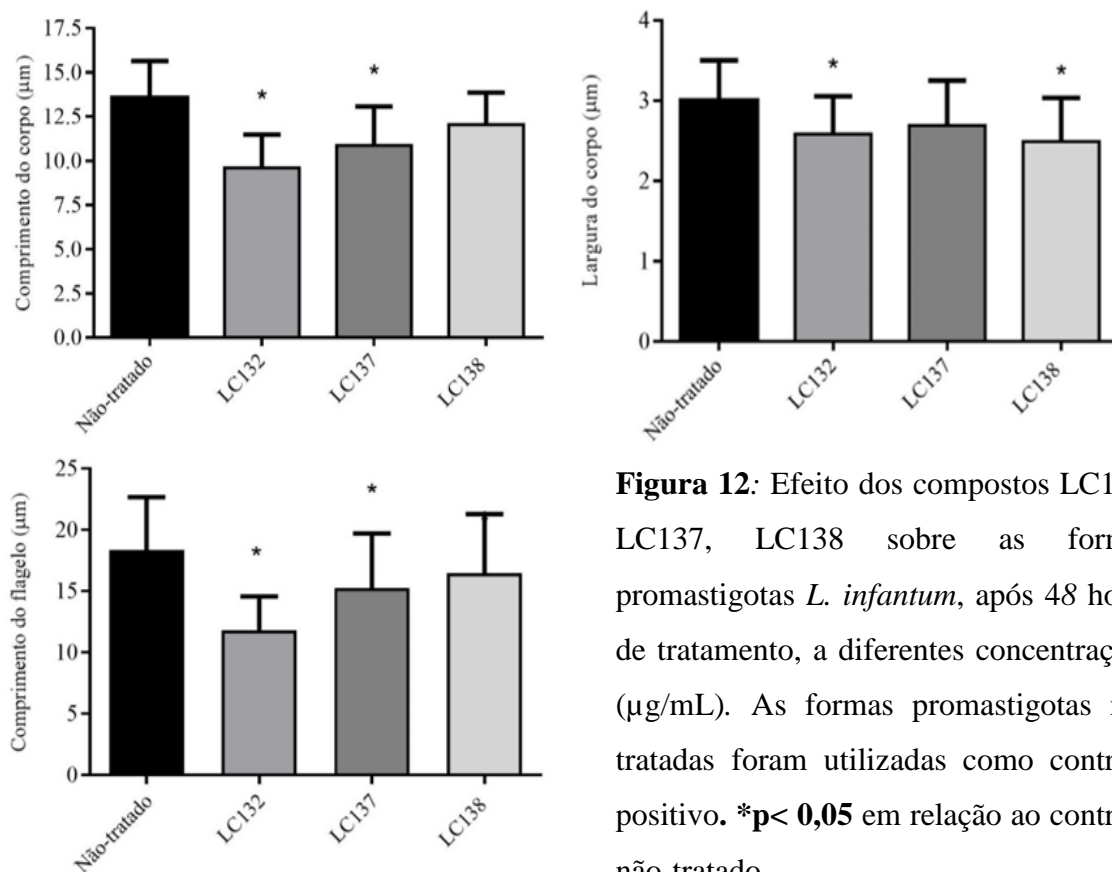


Figura 12: Efeito dos compostos LC132, LC137, LC138 sobre as formas promastigotas *L. infantum*, após 48 horas de tratamento, a diferentes concentrações (µg/mL). As formas promastigotas não tratadas foram utilizadas como controle positivo. * $p < 0,05$ em relação ao controle não-tratado.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

Por não existir uma vacina eficaz, o controle da leishmaniose humana está centrado na quimioterapia. No entanto, o surgimento das resistências e os efeitos secundários graves associados ao uso dos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, bem revisto na literatura, tem suscitado a busca incessante de novos compostos, potencialmente mais eficazes e seguros.

O estudo de suscetibilidades *in vitro* de novos compostos é de fundamental importância para se fazer um primeiro “screening”, antes de prosseguir para o modelo *in vivo*. É de relevância avaliar também a citotoxicidade dos compostos, no sentido de avaliar a segurança em modelos celulares, que poderão dar uma indicação do potencial de toxicidade de determinada substância para posteriores estudos *in vivo*. Estão disponíveis diferentes abordagens de triagem para identificar a atividade farmacológica primária em produtos sintéticos e/ou naturais.

A artemisinina e os seus derivados têm recebido uma atenção especial e têm sido alvo de estudos ao longo dos últimos 30 anos. Vários estudos têm reforçado a sua eficácia contra diversos parasitas, inclusive *Leishmania*. Os endoperóxidos sintéticos são atrativos, principalmente pela sua acessibilidade, dado que a síntese é relativamente económica e a estabilidade metabólica é comparativamente maior, quando comparados com os derivados de artemisinina. Alguns trioxolanos e tetraoxanos demonstraram boa atividade anti-*Leishmania*, por vezes superior ao artesunato (ATN), artemeter (ATM) e dihidroartemisinina.

Estudos *in vitro* revelaram uma baixa toxicidade dos compostos em relação às linhas celulares utilizadas. Relativamente à atividade anti-*Leishmania in vitro* dos compostos peroxídicos estudados, foi observado que estes eram mais eficazes contra formas amastigotas, reforçando a importância de avaliar compostos nestas formas do ciclo de vida de *Leishmania*, uma vez que correspondem às formas relevantes no hospedeiro vertebrado. O endoperóxido que revelou maior efeito anti-*Leishmania* nas formas amastigotas e menor citotoxicidade foi o LC138. Será relevante estudar os

possíveis mecanismos de ação que poderão ser responsáveis pelo efeito letal deste composto nos parasitas *Leishmania*.

O nosso estudo revelou que os valores de CI50 para os compostos estudados variam entre as diferentes espécies de *Leishmania*. O tipo de célula macrófaga bem como a espécie do parasita em estudo pode influenciar os níveis de atividade que são obtidos em ensaios para testar novos compostos anti-*Leishmania*, sendo aconselhável a padronização dos ensaios nos diferentes laboratórios. Segundo Croft (2001), as diferenças bioquímicas e moleculares entre as espécies de *Leishmania* afetam a sensibilidade intrínseca aos compostos.

Estes resultados preliminares encorajam investigações mais profundas sobre o efeito e modo de ação dos endoperóxidos estudados, com o objetivo do seu desenvolvimento para utilização farmacológica, em regime de monoterapia ou em combinação com os atuais fármacos de primeira linha usados no combate a infecções provocadas por *Leishmania spp*, com o objetivo de fomentar o desenvolvimento de formulações que sejam de fácil administração, tenham baixa toxicidade e custo acessível.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi, M. *et al.* (2016) ‘A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), pp. 1–40. doi: 10.1371/journal.pntd.0004349.
- Alborzi, A., Rasouli, M. e Shamsizadeh, A. (2006) ‘*Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(2), pp. 306–307. doi: 74/2/306 [pii].
- Alexander, B. (2000) ‘Sampling methods for phlebotomine sandflies’, *Medical and Veterinary Entomology*, 14, pp. 109–122.
- Alexander, B. e Maroli, M. (2003) ‘Control of phlebotomine sandflies’, *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), pp. 1–18. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00420.x.
- Altamirano-Enciso, A. J. *et al.* (2003) ‘On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- Colombian historical sources’, *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, 10(2), pp. 853–882.
- Alvar, J., Yactayo, S. e Bern, C. (2006) ‘Leishmaniasis and poverty’, *Trends in Parasitology*, 22(12), pp. 552–557. doi: 10.1016/j.pt.2006.09.004.
- Alvar, J. *et al.* (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Alves, A. S. *et al.* (2012) ‘Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*’, *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 93(3), pp. 1329–1333. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.006.
- Anand, D. *et al.* (2017) ‘Antileishmanial Activity of Pyrazolopyridine Derivatives and Their Potential as an Adjunct Therapy with Miltefosine’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(3), pp. 1041–1059. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01447.
- Araujo, N. C. P. *et al.* (2013) ‘Peroxides with antiplasmodial activity inhibit proliferation of *Perkinsus olseni*, the causative agent of Perkinsosis in bivalves’, *Parasitology International*. Elsevier B.V., 62(6), pp. 575–582. doi: 10.1016/j.parint.2013.06.010.

- Aronson, N. *et al.* (2016) ‘Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)’, *Clin Infect Dis*, 63(May), pp. 1539–1557. doi: 10.1093/cid/ciw670.
- Atayde, V. D. *et al.* (2016) ‘*Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions’, *Cellular Immunology*. Elsevier Inc., 309, pp. 7–18. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.013.
- Balint, G. A. (2001) ‘Artemisinin and its derivatives: An important new class of antimalarial agents’, *Pharmacology and Therapeutics*, 90(2–3), pp. 261–265. doi: 10.1016/S0163-7258(01)00140-1.
- Berman, J. (1988) ‘Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy and Future Strategies.’, *Reviews of Infectious Diseases.*, 10(3), pp. 560–586.
- Bern, C. *et al.* (2006) ‘Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis’, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(7), pp. 917–924. doi: 10.1086/507530.
- Bezuneh, A. *et al.* (2014) ‘Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in east African patients’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(6), pp. 1109–1115. doi: 10.4269/ajtmh.13-0759.
- Boelaert, M. e Sundar, S. (2014) ‘Leishmaniasis’, in Farrar, J. *et al.* (eds) *Manson ’ s Tropical Diseases*. 23rd edn. Elsevier Ltd, pp. 632–651.
- Bolhassani, A. *et al.* (2011) ‘Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies’, *Experimental Parasitology*. Elsevier Inc., 127(3), pp. 637–645. doi: 10.1016/j.exppara.2010.12.006.
- Branco, S. *et al.* (2013) ‘Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal’, *Acta Tropica*, 125(3), pp. 339–348. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.12.008.
- Bray, P. G. *et al.* (2003) ‘Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past,

present and future.’, *Trends in Parasitology*, 19(5), pp. 232–239. doi: 10.1016/S1471-4922(03)00069-2.

Bruno de Sousa, C. *et al.* (2017) ‘Antileishmanial activity of meroditerpenoids from the macroalgae *Cystoseira baccata*’, *Experimental Parasitology*, 174, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.exppara.2017.01.002.

Bruno de Sousa, C. *et al.* (2018) ‘Report of in vitro antileishmanial properties of Iberian macroalgae’, *Natural Product Research*. Taylor & Francis, 6419, pp. 1–5. doi: 10.1080/14786419.2018.1434637.

Campino, L. *et al.* (2005) ‘Cutaneous Leishmaniosis in Portugal due to *Leishmania infantum* MON-1’, *Acta Medica Portuguesa*, 18(6), pp. 475–478. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684488>.

Campino, L. *et al.* (2006) ‘Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains’, *Tropical Medicine and International Health*, 11(11), pp. 1708–1714. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x.

Campino, L. e Abranches, P. (2002) ‘Leishmaniose Cutânea - Uma doença rara em Portugal?’, *Acta Medica Portuguesa*, (15), pp. 387–390.

Campino, L. e Maia, C. (2010) ‘Epidemiologia das leishmanioses em Portugal’, *Acta Medica Portuguesa*, 23(5), pp. 859–864.

Chappuis, F. *et al.* (2007) ‘Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?’, *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), pp. 873–882. doi: 10.1038/nrmicro1748.

Chen, J. *et al.* (1995) ‘The topology of the kinetoplast DNA network’, *Cell Press*, 80(1), pp. 61–69. doi: 10.1016/0092-8674(95)90451-4.

Chiaradia, L. D. *et al.* (2007) ‘Síntese , atividade e seletividade de 2-naftilchalconas em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L . chagasi*.’, *Sociedade Brasileira de Química*, 14(12), p. 1.

- Chollet, C. *et al.* (2008) 'In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 62(7), pp. 462–465. doi: 10.1016/j.biopha.2008.04.003.
- Coombs, G. H. *et al.* (1986) 'Three dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections.', *Parasitology*, 92(1), pp. 13–23. doi: 10.1017/S0031182000063411.
- Cortes, S. *et al.* (2007) 'Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal', *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), pp. 1431–1432. doi: 10.3201/eid1309.070101.
- Cortes, S. *et al.* (2012) 'Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 189(2–4), pp. 189–196. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.028.
- Cortes, S. *et al.* (2015) 'In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to artemisinin derivatives and selected trioxolanes', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), pp. 5032–5035. doi: 10.1128/AAC.00298-15.
- Cos, P. *et al.* (2006) 'Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”', *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), pp. 290–302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003.
- Costa, C. H. N. *et al.* (2000) 'Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*', *The Journal of Infectious Diseases*, 182(3), pp. 997–1000. doi: 10.1086/315795.
- Croft, S. L. (2001) 'Monitoring drug resistance in leishmaniasis', *Tropical Medicine and International Health*, 6(11), pp. 899–905. doi: 10.4103/0974.
- Croft, S. L. e Olliaro, P. (2011) 'Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities', *Clinical Microbiology and Infection*, 17, pp. 1478–1483. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x.
- Cuvillier, A. *et al.* (2003) 'Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites', *Cellular Microbiology*, 5(10), pp. 717–728. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x.

- Daigneault, M. *et al.* (2010) 'The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages', *PLoS ONE*, 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008668.
- Dantas-Torres, F. *et al.* (2012) 'Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 28(12), pp. 531–538. doi: 10.1016/j.pt.2012.08.007.
- Das, P. *et al.* (2013) 'Protease inhibitors in potential drug development for Leishmaniasis.', *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 50(5), pp. 363–376. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24772958>.
- David, C. V. e Craft, N. (2009) 'Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis', *Dermatologic Therapy*, 22, pp. 491–502. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x.
- Davidson, R. N. (2017) 'Leishmaniasis', *Infectious Diseases*, pp. 1059-1064.e1. doi: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00123-4.
- Desjeux, P. (2001) 'The increase in risk factor for leishmaniasis worldwide', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, pp. 239–243.
- Desjeux, P. e Alvar, J. (2003) '*Leishmania* /HIV co-infections: epidemiology in Europe', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(Sup 1), pp. 3–15. doi: 10.1179/000349803225002499.
- Duarte, M. C. *et al.* (2016) 'An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 217, pp. 81–88. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.01.002.
- Dujardin, J. C. *et al.* (2008) 'Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe', *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), pp. 1013–1018. doi: 10.3201/eid1407.071589.
- Dutta, A. *et al.* (2007) 'Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes', *Journal of Medical Microbiology*, 56(5), pp.

629–636. doi: 10.1099/jmm.0.47039-0.

Ekwall, B. *et al.* (1990) ‘Toxicity tests with mammalian cell cultures’, *Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects*, pp. 75–98. doi: 10.1155/2014/180549.

Farah, F. S., Samra, S. e Nuwayri-Salti, N. (1975) ‘The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis.’, *Immunology*, 29(4), pp. 755–764.

Ferrari, M., Fornasiero, M. C. e Isetta, A. M. (1990) ‘MTT colorimetric assay for testin macrophage cytotoxic activity in vitro’, *Journal of immunological methods*, 131, pp. 165–172.

Fraga, T. L. *et al.* (2010) ‘Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(May), pp. 310–313. doi: 10.1590/S0074-02762010000300011.

Galiana-Roselló, C. *et al.* (2013) ‘In vitro and in vivo antileishmanial and trypanocidal studies of new N -benzene- and N -naphthalenesulfonamide derivatives’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(22), pp. 8984–8998. doi: 10.1021/jm4006127.

Garcez, L. M., Shaw, J. J. e Silveira, F. T. (1996) ‘Teste De Aglutinação Direta No Sorodiagnóstico Da Leishmaniose Visceral No Estado Do Pará’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(2), pp. 165–180.

Gomes, R. M. da S. *et al.* (2009) ‘Análise TG-ROC de testes de imunofl uorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina’, *Rev Saúde Pública*, 43(6).

González-Aseguinolaza, G. *et al.* (1997) ‘Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1361(1), pp. 92–102. doi: 10.1016/S0925-4439(97)00018-5.

Gramiccia, M. (2011) ‘Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis’, *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 181(1), pp. 23–30. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.019.

- Grevelink, S. A. e Lerner, E. A. (1996) 'Leishmaniasis', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2), pp. 257–272. doi: 10.1016/S0190-9622(96)80121-6.
- Guerra, J. A. de O. *et al.* (2011) 'Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), pp. 1–5. doi: 10.1371/journal.pntd.0000980.
- Gupta, S. e Nishi (2011) 'Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery', *Indian Journal of Medical Research*, 133, pp. 27–39. doi: IndianJMedRes_2011_133_1_27_76700 [pii].
- Hefnawy, A. *et al.* (2017) 'Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 33(3), pp. 162–174. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.003.
- Herwaldt, B. L. (1999) 'Leishmaniasis', *The Lancet*, 354(9185), pp. 1191–1199. doi: 10.1016/S0140-6736(98)10178-2.
- Ho, W. E. *et al.* (2014) 'Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 142(1), pp. 126–139. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.001.
- Isnard, A., Shio, M. T. e Olivier, M. (2012) 'Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(May), pp. 1–9. doi: 10.3389/fcimb.2012.00072.
- Itagaki, H. *et al.* (1998) 'Validation Study on Five Cytotoxicity Assays: Details of the MTT Assay', *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 5, pp. 119–130.
- Jain, S. K. *et al.* (2012) 'A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute Monocytic Leukemia Cell Line', *Journal of Visualized Experiments*, (70), pp. 1–14. doi: 10.3791/4054.
- Ben Kahla-Nakbi, A. *et al.* (2010) 'Screening of antileishmanial activity from marine sponge extracts collected off the Tunisian coast', *Parasitology Research*, 106(6), pp.

1281–1286. doi: 10.1007/s00436-010-1818-x.

Kamau, S. W., Nunez, R. e Grimm, F. (2001) ‘Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes’, *BMC Pharmacology*, 1, p. 10. doi: 10.1186/1471-2210-1-1.

Killick-Kendrick, R. (2002) ‘Phlebotomine sand flies: biology and control’, in Farrell, J. P. (ed.) *Leishmania. World Class Parasites*. vol. 4. Springer, Boston, MA, pp. 33–43. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0955-4_3.

Kumar, R. *et al.* (2001) ‘Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis’, *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(6), pp. 1220–1224. doi: 10.1128/CDLI.8.6.1220-1224.2001.

Kumar, V., Mahajan, A. e Chibale, K. (2009) ‘Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products’, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd, 17(6), pp. 2236–2275. doi: 10.1016/j.bmc.2008.10.072.

Lage, P. S. *et al.* (2015) ‘Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*’, *Parasitology Research*, 114(12), pp. 4625–4635. doi: 10.1007/s00436-015-4708-4.

Lainson, R. (2010) ‘The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy’, *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2), pp. 13–32. doi: 10.5123/S2176-62232010000200002.

Lainson, R. e Shaw, J. J. (1972) ‘Taxonomy of the New World *Leishmania* species’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. No longer published by Elsevier, 66(6), pp. 943–944. doi: 10.1016/0035-9203(72)90133-2.

Laurenti, M. D. (2009) ‘Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina’, *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*, 6(67), pp. 13–23. Available at: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-

42722009000700002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

Lemaire, S. *et al.* (2014) ‘Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), pp. 2059–2066. doi: 10.1128/AAC.02475-13.

Lessa, M. M. *et al.* (2007) ‘Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos’, *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 73(6), pp. 843–847. doi: 10.1590/S0034-72992007000600016.

Lira, R. *et al.* (1999) ‘Evidence that the high incidence of treatment failures in indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*’, *The Journal of Infectious Diseases*, 180(2), pp. 564–567. doi: 10.1086/314896.

Lobo, L. (2012) *Avaliação in vitro e in vivo da atividade antimalárica dos trioxolanos NAC89 , LDC67 e LC50 em estirpes sensíveis e resistentes à artemisinina e ao artesunato*. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa. pp 93.

Lobo, L. *et al.* (2016) ‘Highly active ozonides selected against drug resistant malaria’, 111(7), pp. 450–453. doi: 10.1590/0074-02760160077.

Lobo, L. *et al.* (2018) ‘New endoperoxides highly active in vivo and in vitro against artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*’, *Malaria Journal*. BioMed Central, 17(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12936-018-2281-x.

Loo, C. S. N. *et al.* (2017) ‘Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria’, *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 117, pp. 192–217. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.012.

López-Céspedes, A. *et al.* (2012) ‘*Leishmania* spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula’, *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 1–10. doi: 10.1100/2012/945871.

Da Luz, R. I. *et al.* (2009) ‘In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: Preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells’,

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5197–5203. doi: 10.1128/AAC.00866-09.
- Maia, C. *et al.* (2007) ‘Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*’, *Acta Tropica*, 103(2), pp. 150–155. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.06.001.
- Maia, C. *et al.* (2010) ‘Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up’, *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 116(3), pp. 193–199. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.08.001.
- Maia, C. *et al.* (2010) ‘Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal’, *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 174(3–4), pp. 336–340. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.08.030.
- Maia, C. e Campino, L. (2014) ‘Leishmaniose em Portugal no início do século XXI’, in *Anais IHMT, Saúde Global e Doenças Tropicais*, pp. 25–28.
- Maia, C., Nunes, M. e Campino, L. (2008) ‘Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal’, *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), pp. 555–559. doi: 10.1089/vbz.2007.0247.
- Maia, Z. *et al.* (2012) ‘Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pntd.0001484.
- Mansueto, P. *et al.* (2007) ‘Immunopathology of leishmaniasis: An update’, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 20(3), pp. 435–445. doi: 10.1177/039463200702000302.
- Marti, F. *et al.* (2011) ‘Second generation analogues of RKA182: Synthetic tetraoxanes with outstanding in vitro and in vivo antimalarial activities’, *MedChemComm*, 2(7), pp. 661–665. doi: 10.1039/c1md00102g.
- Maurer, M., Dondji, B. e Von Stebut, E. (2009) ‘What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis’, *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), pp. 137–146. doi: 10.1007/s00430-009-0114-9.

- Mauricio, I. L. *et al.* (2007) ‘Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*’, *International Journal for Parasitology*, 37(5), pp. 565–576. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.11.020.
- Mendes, E. A. *et al.* (2016) ‘C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*’, *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ltd, 256, pp. 16–24. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.018.
- Miranda, B. (2017) *Avaliação do potencial imunogênico e protetor da proteína ligante de heparina LPG 3 recombinante de Leishmania infantum chagasi*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. pp 111.
- Monge-Maillo, B. *et al.* (2014) ‘Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean Region’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pntd.0003021.
- Morillas-Marquez, F. *et al.* (2002) ‘*Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing’, *Experimental Parasitology*, 100(1), pp. 71–74. doi: 10.1006/expr.2001.4678.
- Neto, L. da S. *et al.* (2015) ‘Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil’, *Semina: Ciências Agrárias*, 36(3), pp. 1467–1480. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1467.
- Neto, R. L. M. *et al.* (2011) ‘Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*’, *Experimental Parasitology*. Elsevier Inc., 127(1), pp. 215–221. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.020.
- Neves, D. P. *et al.* (1997) ‘Parasitologia Humana’, *Atheneu*, p. 498. doi: 10.1086/521246.
- Nwaka, S. *et al.* (2011) ‘Integrated dataset of screening hits against multiple neglected disease pathogens’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), p. e1412. doi: 10.1371/journal.pntd.0001412.

- O'Neill, P. M., Barton, V. E. e Ward, S. A. (2010) 'The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues', *Molecules*, 15(3), pp. 1705–1721. doi: 10.3390/molecules15031705.
- Okwor, I. e Uzonna, J. (2016) 'Social and economic burden of human leishmaniasis', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3), pp. 489–493. doi: 10.4269/ajtmh.15-0408.
- Oliveira, M. (2014) *Optimization of screening methods for the evaluation of the antileishmanial potential of halophytes and macroalgae from the Iberian Coast*. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa. pp 124.
- Olliaro, P. L. *et al.* (2005) 'Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004.', *The Lancet infectious diseases*, 5(December), pp. 763–774. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70296-6.
- Opsenica, D. M. e Šolaja, B. A. (2009) 'Antimalarial peroxides', 74(11), pp. 1155–1193. doi: 10.2298/JSC0911155.
- Oren, R. *et al.* (1991) 'Visceral leishmaniasis: A difficult diagnosis and unusual causative agent', *Journal of Infectious Diseases*, 164(4), pp. 746–749. doi: 10.1093/infdis/164.4.746.
- Otranto, D. e Dantas-Torres, F. (2013) 'The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 29(7), pp. 339–345. doi: 10.1016/j.pt.2013.05.003.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J. e Papadopoulou, B. (2004) 'Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments', *Drug Resistance Updates*, 7(4–5), pp. 257–266. doi: 10.1016/j.drug.2004.07.002.
- Pennisi, M. G. (2015) 'Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 208(1–2), pp. 35–47. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.023.
- Piscopo, T. V e Mallia Azzopardi, C. (2007) 'Leishmaniasis', *Postgraduate Medical*

Journal, 83(976), pp. 649–657. doi: 10.1136/pgmj.2006.047340corr1.

Ponte-Sucre, A. *et al.* (2017) ‘Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge’, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), p. e0006052. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.

Rath, S. *et al.* (2003) ‘Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte’, *Química Nova*, 26(4), pp. 550–555. doi: 10.1590/S0100-40422003000400018.

Ready, P. D. (2014) ‘Epidemiology of visceral leishmaniasis’, *Clinical Epidemiology*, 6(1), pp. 147–154. doi: 10.2147/CLEP.S44267.

Reiter-Owona, I. *et al.* (2016) ‘Specific K39 antibody response and its persistence after treatment in patients with imported leishmaniasis’, *Parasitology Research*, 115(2), pp. 761–769. doi: 10.1007/s00436-015-4801-8.

Rey, L. (2010) *Bases da Parasitologia Médica*. 3ª edição. Edited by G. Koogan. Rio de Janeiro.

Ribeiro, A. S. F. F. (2014) *Avaliação de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) e uma técnica molecular (qPCR em amostra de pele) no diagnóstico de infecção por Leishmania infantum em cães Resumo*. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

Rodriguez, N. *et al.* (1994) ‘Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization’, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(9), pp. 2246–2252.

Salotra, P. *et al.* (2001) ‘Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of *Leishmania donovani* in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis’, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3), pp. 849–854. doi: 10.1128/JCM.39.3.849.

Saporito, L. *et al.* (2013) ‘Visceral leishmaniasis: Host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host’, *International Journal of Infectious Diseases*. International Society for Infectious Diseases, 17(8), pp. e572–e576. doi: 10.1016/j.ijid.2012.12.024.

- Séguin, O. e Descoteaux, A. (2016) ‘*Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite’, *Cellular Immunology*, 309, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.08.004.
- Sereno, D. *et al.* (2007) ‘Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures’, *Parasitology International*, 56(1), pp. 3–7. doi: 10.1016/j.parint.2006.09.001.
- Shadab, M. *et al.* (2017) *Apoptosis-like cell death in Leishmania donovani treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B*, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0171306.
- Da Silva, M. R. B., Stewart, J. M. e Costa, C. H. N. (2005) ‘Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(6), pp. 811–814. doi: 72/6/811 [pii].
- Simpson, L. (1987) ‘The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution’, *Annual Review of Microbiology*, 41(1), pp. 363–380. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002051.
- Simsek, M. *et al.* (2018) ‘The teratogenicity of allopurinol : A comprehensive review of animal and human studies’, *Reproductive Toxicology*. Elsevier, 81, pp. 180–187. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.08.012.
- Singh, N., Kumar, M. e Singh, R. K. (2012) ‘Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets’, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Hainan Medical College, 5(6), pp. 485–497. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.
- Singh, S. e Sivakumar, R. (2003) ‘Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis.’, *Journal of Postgraduate Medicine*, 49(1), p. 55. doi: 10.4103/0022-3859.927.
- Soares-Bezerra, R. J., Leon, L. e Genestra, M. (2004) ‘Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos’, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40(2), pp. 139–149. doi: 10.1590/S1516-93322004000200003.

- Srivastava, P. *et al.* (2011) ‘Diagnosis of visceral leishmaniasis’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 105(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.09.006.
- Steverding, D. (2017) ‘The history of leishmaniasis’, *Parasites and Vectors*, 10(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5.
- Su, X. e Miller, L. H. (2015) ‘The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine’, *Sci China Life Sci.*, 58(11), pp. 1175–1179. doi: 10.1007/s11427-015-4948-7.The.
- Sundar, S. e Olliaro, P. L. (2007) ‘Miltefosine in the treatment of leishmaniasis : Clinical evidence for informed clinical risk management’, 3(5), pp. 733–740.
- Thiakaki, M. *et al.* (2006) ‘Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice’, *Microbes and Infection*, 8(6), pp. 1455–1463. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.006.
- Torpiano, P. e Pace, D. (2015) ‘Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe’, *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Taylor & Francis, 13(9), pp. 1123–1138. doi: 10.1586/14787210.2015.1056160.
- Vennerstrom, J. L. *et al.* (2004) ‘Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate’, *Nature*, 430(7002), pp. 900–904. doi: 10.1038/nature02779.
- Vermeersch, M. *et al.* (2009) ‘In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), pp. 3855–3859. doi: 10.1128/AAC.00548-09.
- WHO (2010) ‘Control of the leishmaniases.’, *World Health Organization*, (949), pp. 22–26. doi: 10.1038/nrmicro1766.
- WHO (2015) *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015*. doi: 10.1007/s00247-015-3337-5.

- WHO (2017a) *Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in de WHO European Region*. Edited by L. Gradoni, R. López-Vélez, and M. Mokni. WHO.
- WHO (2017b) *WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance, World Health organization Geneva*. doi: 10.1186/1750-9378-2-15.Voir.
- Wijnant, G. J. *et al.* (2018) ‘Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis’, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Elsevier, 8(2), pp. 223–228. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.04.001.
- Wilson, W. D. *et al.* (2008) ‘Antiparasitic compounds that target DNA’, *Biochimie*, 90(7), pp. 999–1014. doi: 10.1016/j.biochi.2008.02.017.
- Yardley, V. and Croft, S. L. (2000) ‘A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis’, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13(4), pp. 243–248. doi: 10.1016/S0924-8579(99)00133-8.
- Yasur-Landau, D. *et al.* (2016) ‘Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), p. e0004341. doi: 10.1371/journal.pntd.0004341.
- Yasur-Landau, D. *et al.* (2017) ‘Induction of allopurinol resistance in *Leishmania infantum* isolated from dogs’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), p. e0005910. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005910>.
- Zambrano-Villa, S. *et al.* (2002) ‘How protozoan parasites evade the immune response’, *Trends in Parasitology*, 18(6), pp. 272–278. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02289-4.

ANEXOS

Anexo A: Tabela com as estruturas dos compostos

<i>Natureza</i>	<i>Referências</i>	<i>Estruturas</i>
Tetraoxanos	LC137	
	LC138	
	LC139	
	LC140	
	LC163	
	LC146	
Trioxolanos	LC50	
	LC93	
	LC129	
	LC131	
	LC132	
	LC136	

Anexo A: Tabela com as estruturas dos compostos (continuação)

<i>Natureza</i>	<i>Referências</i>	<i>Estruturas</i>
Derivados de Artemisinina	Di-hidroartemisinina (DHA)	<p>The structure shows a complex polycyclic ring system with two ether bridges and a hydroxyl group at the C-10 position.</p>
	Desoxi di-hidroartemisinina (D-DHA)	<p>The structure is similar to DHA but lacks the hydroxyl group at the C-10 position.</p>
	Artesunato (ATS)	<p>The structure features the dihydroartemisinin core with a succinate ester group at the C-15 position, shown as a sodium salt.</p>
	Desoxi-Artesunato (D-ATS)	<p>The structure is similar to Artesunate but lacks the hydroxyl group at the C-10 position.</p>

Anexo B: Gama de concentrações dos compostos usados nos ensaios

Compostos	Concentração solução “stock”	Concentrações testadas (µg/mL)		
		Linha celular	Promastigotas	Amastigotas
Anfotericina B	250 µg/mL	50/25/12.5/6.25/3.12/1.56	0.8/0.4/0.2/0.1/0.05/ 0.025	0.4/0.2/0.1/0.05/0.025/ 0,013
Miltefosina	200 µmg/mL	60/30/15/7.5/3.75/1.87 600/300/150/75/37.5/18.75	50/25/12.5/6.25/3.12/ 1.56	20/10/5/2,5/1,25/0,625
Pentamidina	200 µg/mL	2/1/0.5/0.25/0.12/0.06 5/2.5/1.25/0.625/0.31/0.156	1/0.5/0.25/0.125/0.06/ 0.03	1/0.5/0.25/0.125/0.06/ 0.03
ATS	215 mg/mL	100/50/25/12.5/6.25/3.12 300/150/75/37.5/18.75/9.4	50/25/12.5	20/10/5/2,5/1,25/0,625
D-ATS	200 mg/mL	300/150/75/37.5/18.75/9.4	150/75/37.5	150/75/37.5/18.75/9.4/ 4,7
DHA	112.5 mg/mL	100/50/25/12.5/6.25/3.12 300/150/75/37.5/18.75/9.4	60/30/15	20/10/5/2,5/1,25/0,625
D-DHA	210 mg/mL	300/150/75/37.5/18.75/9.4	150/75/37.5	150/75/37.5/18.75/9.4/ 4,7
LC50	100 mg/mL	300/150/75/37.5/18.75/9.4 600/300/150/75/37.5/18.75	150/75/37.5	
LC93	41 mg/mL	50/25/12.5/6.25/3.12/1.56 600/300/150/75/37.5/18.75	100/50/25/12.5/6.25/ 3.12	
LC129	100 mg/mL	200/100/50/25/12.5/6.25 600/300/150/75/37.5/18.75	150/75/37.5	
LC131	45 mg/mL	50/25/12.5/6.25/3.12/1.56 600/300/150/75/37.5/18.75	100/50/25/12.5/6.25/ 3.12	
LC132	215 mg/mL	50/25/12.5/6.25/3.12/1.56	10/5/2,5	40/20/10/5/2,5/1,25
LC136	44 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	200/100/50/25/12.5/ 6.25	
LC137	107.5 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	100/50/25	80/40/20/10/5/2,5
LC138	200 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	200/100/50	150/75/37.5/18.75/9.4/ 4,7

LC139	210 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	200/100/50	
LC140	210 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	200/100/50	
LC146	102.5 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	300/150/75	
LC163	220 mg/mL	600/300/150/75/37.5/18.75	300/150/75	