



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização da internalização de fármacos antileishmania e novos compostos por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp.

Autor: Mariana Rafael Fernandes

Orientador: Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes

Coorientador: Investigadora Ana Armada

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Apoio financeiro da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) e da União Europeia (FEDER) através dos projetos PTDC/CVT/113121/2009 e PTDC/CVT/118566/2010 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do projecto 2013/16297-2

Publicações e comunicações

Publicações: artigos em preparação

- Mariana Rafael-Fernandes, David Santos-Mateus, Liliane Rocha Armanda Rodrigues, Luiz Felipe Passero, Ana Valério-Bolas; Bartira Rossi-Bergmann, João Henrique Lago, Graça Alexandre-Pires, Ana Maria Armada, Gabriela Santos-Gomes. The effect of efflux pump modulators in the internalization of antileishmanial drugs by macrophage infected with cutaneous and visceral *Leishmania* parasites (artigo em preparação)

- Ana Valério-Bolas; Maria Pereira; David Santos-Mateus; Armanda Rodrigues; Mariana Rafael-Fernandes; Mafalda Claro; Gabriela Santos-Gomes. Effect of cutaneous and visceral *Leishmania* parasites in the activation of murine phagocytic cells (artigo em preparação)

- David Santos-Mateus, Alexandra Esteves, Maria Armanda Rodrigues, Manuela Carvalheiro, Rui Lopes, Mariana Rafael-Fernandes, Eugénia Cruz, Gabriela Santos-Gomes. Genotypic analysis of *Leishmania infantum* resistance to new chemically synthesized antileishmanial compounds: Gene quantification as a method to evaluate parasite sensitivity to drugs and to uncover the mechanisms behind it. (artigo em preparação)

Comunicações orais em congressos

- G. Santos-Gomes, D. Santos-Mateus, A. Valério-Bolas, M. Rafael-Fernandes, AR Silva-Pedrosa, M. Aires Pereira, A. Rodrigues. Leishmaniose Humana. Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários, 30 e 31 de Novembro de 2014, Lisboa

- G. Santos-Gomes, D. Santos-Mateus, A. Valério-Bolas, M. Rafael-Fernandes, M. Claro, A. Rodrigues, M. Aires Pereira. Imunidade e resposta imunitária na leishmaniose canina. Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários, 30 de Novembro e 1 de Dezembro de 2013, Lisboa

- Rodrigues, A., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D, Aires-Pereira, M., Valério-Bolas, A, Rafael-Fernandes, M., Marques, C., Fonseca, I., Santos-Gomes, G. Impacto na função metabólica e na resposta imunitária de hepatócitos de cão expostos a *Leishmania infantum*. 4as Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 13 Dezembro de 2013. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa

-Rodrigues, A., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D., Marques, C., Valério-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Fonseca, I., Santos-Gomes, G. Impact on the metabolic function and immune activity of dog hepatocytes when exposed to *Leishmania infantum*. EMBO Forum. Instituto de Medicina Molecular, 15 e 16 Julho de 2013, Lisboa

Comunicações em poster

-Rodrigues, A., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D., Valério-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Aires-Pereira, M., Pereira-da- Fonseca, I., Santos-Gomes, G. Impact on cell metabolism of dog hepatocytes when exposed to *Leishmania infantum*. Congress of the European Association of Veterinary Anatomists (EAVA), 23 e 26 de Julho de 2014, Roménia. In Proceedings of the XXXth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists *Anatomia, Histologia, Embryologia* 43: 80.

-Valério-Bolas, A., Pereira, MA, Santos, M., Rafael-Fernandes, M., Rodrigues, A., Santos-Mateus, D., Claro, M., Pereira da Fonseca, I., Santos-Gomes, GM. Importance of neutrophils and macrophages in the immune response to *Leishmania* spp. Infection. iMed 5.0 Conference, 11 a 13 de Outubro de 2013, Lisboa.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes**, pela excepcional orientação científica e profissional. Tenho a agradecer-lhe todos os comentários, sugestões e conselhos fundamentais para o sucesso deste trabalho. Obrigado por ser como é, o sucesso do nosso grupo, é o reflexo do seu empenho e dedicação. Durante este período, não foi só a “Chefe”, tornou-se acima de tudo uma Amiga. Tenho a agradecer-lhe tudo o que fez por mim, por me ter acolhido no seu grupo, pelas oportunidades educativas que me proporcionou e me ter ensinado a fazer ciência com rigor e qualidade.

À minha coorientadora, **Investigadora Ana Armada**, por toda a partilha científica, sugestões, comentários, ensinamentos e apoio. Mesmo nas horas mais difíceis, teve sempre uma palavra de incentivo e uma ajuda fundamental na procura de soluções.

Ao **Prof. Celso Cunha**, por me ter permitido ingressar no mestrado que tanto ambicionava. Agradeço ter-me proporcionado um ensino de qualidade, devido à sua dedicação e empenho nas funções como coordenador do mestrado.

À **Prof. Doutora Graça Alexandre-Pires**, pela sua boa disposição característica e empenho. Agradeço-lhe todo o trabalho e esforço que fez para que fosse possível ter fotografias de Microscopia Eletrónica de Varrimento de promastigotas e amastigotas axénicos.

Ao **Doutor Luiz Felipe Passero**, por me ter facultado a maioria das estirpes que constituem este trabalho e ter dado acesso aos novos compostos ácido ursólico e ácido oleanólico. Agradeço também toda a disponibilidade demonstrada, o seu apoio foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

À **Doutora Bartira Rossi Bergmann**, por me cedido os compostos chalcona (CH8) e quercetina. Sem eles, parte do sucesso do meu trabalho estaria comprometido.

Ao **Doutor João Lago**, por gentilmente me ter cedido os novos compostos ácido ursólico e ácido oleanólico. A utilização destes compostos contribuiu em muito para o sucesso do meu trabalho.

À **Doutora Liliane Rocha**, por gentilmente me ter cedido uma estirpe para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Doutora Maria Luísa Vieira**, à **Prof. Doutora Carla Sousa**, à **Prof. Doutora Odete Afonso**, ao **Prof. Doutor Ricardo Parreira** e à **Prof. Doutora Isabel Couto**; por mesmo não estando envolvidos na minha dissertação, sempre terem demonstrado interesse e preocupação com o seu desenrolar.

Ao **Grupo Imunologia Parasitária e Vacinas** do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela forma como me acolheram e me ensinaram tudo o que sei. Mais do que um grupo de trabalho, tornámo-nos numa família. Saber rir, mesmo nas horas difíceis é o nosso lema. E fazer ciência neste grupo é simples, porque a partilha de conhecimentos e experiência é constante. A todos, um sincero obrigado.

Ao **Grupo de Micobactérias** do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por me terem acolhido em parte do desenvolvimento do meu trabalho e sempre me terem facultado tudo o que necessitei.

Ao **David Mateus**, tenho a agradecer tudo. Foste fundamental para o meu sucesso e para o sucesso deste trabalho. Tenho que agradecer-te todo o apoio, ajuda, ensinamentos, paciência, dedicação e amizade. Nas situações mais difíceis foste sempre o meu apoio e

conseguiu que aprendesse a manter a calma. Ajudaste-me a procurar soluções, fizeste-me pensar e ensinaste-me a pensar mais além. Fazer ciência, sem as nossas discussões científicas, não tem graça nenhuma.

À **Armanda Rodrigues**, por tudo o que me ensinou e por sempre me ter ajudado nas dúvidas que surgiam. O teu apoio sempre que solicitado, foi muitas vezes fundamental para o sucesso do meu trabalho. E nunca mais me esqueço: um erro só é grave quando não sabemos remediá-lo.

À **Ana Bolas**, pela partilha ao longo dos dois anos de mestrado e por tudo o que ensinou quando cheguei ao laboratório. Obrigado pela boa disposição, simpatia e alegria e por tornares os meus dias mais felizes.

À **Débora Almeida**, por todo o companheirismo, amizade e boa disposição que perduram desde o primeiro dia. És do que melhor guardo do mestrado. As nossas discussões científicas, por vezes filosóficas, fizeram com que este mestrado fosse inesquecível. Agradeço também toda a preocupação sempre demonstrada.

Ao **João Tavanez**, por tornar os dias do laboratório pouco monótonos. O pensamento *outside the box*, foi uma mais valia para o sucesso do meu trabalho e um ensinamento para a vida.

À **Carla Tavares**, pela sua cabeça no ar que tantas vezes animou as aulas até às oito da noite e as noitadas de trabalho. O nosso grupo de trabalho ficará para sempre, por todos os obstáculos que ultrapassámos juntas.

Aos **colegas de mestrado**, que foram parte fundamental da aprendizagem adquirida no ano curricular. Agradeço toda a boa disposição, ajuda e apoio, ao longo destes dois anos.

Aos **meus pais**, por todo apoio aos mais diversos níveis. Tenho a agradecer-lhes tudo o que consegui fazer e todo o seu empenho no meu sucesso e realização profissional. Sem vocês, jamais seria o que sou hoje.

À minha **família**, por ter sido sempre fundamental para o meu sucesso.

Ao **Pedro**, por sempre me ter apoiado. Nas horas mais difíceis, foste sempre o meu grande apoio.

Aos meus **Amigos**, que sempre me apoiaram e tornaram as horas de maior preocupação em pequenos desabafos e risadas.

À **Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT)**, **União Europeia (FEDER)** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Resumo

Devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade, a leishmaniose é uma das doenças parasitárias com maior impacto no Mundo. Um dos problemas associado ao controlo das leishmanioses é a emergente resistência dos parasitas aos fármacos usados clinicamente. A resistência de parasitas do género *Leishmania* aos fármacos clássicos tem sido associada a bombas de efluxo, em particular aos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) que conferem o fenótipo de MDR (*multidrug resistance*). Com a eficácia dos fármacos clássicos comprometida, o desenvolvimento de novos compostos com atividade antileishmania e a terapêutica combinada parecem ser as melhores estratégias para o tratamento da leishmaniose. A presente dissertação teve como objetivo principal caracterizar a internalização de fármacos antileishmania clássicos e de novos compostos por promastigotas e amastigotas axénicos de diferentes espécies de *Leishmania* e por macrófagos parasitados, identificando vias e mecanismos que privilegiem a destruição do parasita pelos fármacos, minimizando em simultâneo, qualquer ação nefasta na célula hospedeira. O efluxo de diversos inibidores de bombas de efluxo (tioridazina, promezina, prometazina, verapamil, ortovanadato de sódio e Phe-Arg Beta-Naphthylamid) foi analisado em macrófagos e parasitas do género *Leishmania* por um método fluorimétrico semi-automático que quantifica a acumulação de EtBr em tempo real. Após a análise da toxicidade e eventual atividade antileishmania dos inibidores de bombas de efluxo (EPI) foi caracterizada *in vitro* a internalização de fármacos clássicos (antimoniato de meglumina e miltefosina) e de novos compostos [ácido ursólico, chalcona (CH8), quercetina e a associação de ácido oleanólico e ácido ursólico] em promastigotas axénicos e macrófagos. Os resultados obtidos permitiram selecionar o verapamil (VER), ortovanadato de sódio (ORT) e Phe-Arg Beta-Naphthylamide (PABN) como possíveis moduladores de bombas de efluxo de *Leishmania*. A taxa de infeção de macrófagos após tratamento com miltefosina, ácido ursólico, CH8 e quercetina em monoterapia ou em associação com os EPI selecionados foi também determinada. PABN modifica a atividade de transportadores que efluxam substratos, nomeadamente transportadores do tipo AcrAB em bactérias, potenciando o efeito da terapêutica na maioria dos parasitas do género *Leishmania*. Por sua vez, o VER estabelece relações de sinergia com os compostos através da modulação de bombas Pgp. Porém, as funções do ORT podem ser alteradas por outros compostos, como a quercetina, apresentando atividades variáveis. Para além disso, a capacidade dos EPI modularem os transportadores responsáveis pelo efluxo dos fármacos varia com a espécie de *Leishmania*. A associação de EPI ao tratamento favorece a atividade antileishmania de compostos que são substratos de bombas de efluxo, como é o caso da miltefosina e da CH8. O presente estudo demonstra que os EPI são uma opção válida que deve ser fortemente considerada em terapêutica combinada. A eventual utilização de EPI pode contribuir para potenciar a atividade de fármacos antileishmania, reduzindo a concentração dos compostos e, conseqüentemente os efeitos tóxicos, prevenindo o aparecimento de resistências.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., efluxo, bombas, fármacos, MDR

Abstract

Leishmaniasis is one of the parasitic diseases with the greatest impact in the world as a consequence of high morbidity and mortality. One of the problems associated with the control of leishmaniasis is the emerging parasite resistance to clinically used drugs. *Leishmania* parasites resistant to classical therapeutic drugs have been associated with efflux pumps, in particular the ATP-binding cassette transporters (ABC) which confer the multidrug resistance phenotype (MDR). Compromised the efficacy of classical drugs, the development of new antileishmanial compounds and combined drug therapies seem to be the best strategies for the treatment of leishmaniasis in a near future. The present study aimed to characterize the internalization of classic antileishmanial drugs and new compounds by promastigotes and axenic amastigotes of different *Leishmania* species and infected macrophages identifying pathways and mechanisms that favor the parasite destruction by drugs, while minimizing any harmful action in the host cell. The effect of efflux pump inhibitors (EPI) (thioridazine, promezina, promethazine, verapamil, sodium orthovanadate and beta-Phe-Arg Naphthylamid) was evaluated in macrophages and *Leishmania* parasites using a semi-automated fluorimetric method that quantifies in real time the accumulation of EtBr. After examination of the toxicity and possible antileishmanial activity of EPI, *in vitro* internalization of classic drugs (meglumine antimoniate and miltefosine) and new compounds with antileishmanial activity [ursolic acid, chalcone (CH8), quercetin and the association of oleanolic acid and ursolic acid] was assessed in promastigotes and macrophages. The results obtained allowed selection of verapamil (VER), sodium orthovanadate (ORT) and Phe-Arg beta-naphthylamide (PAβN) as possible modulators of *Leishmania* efflux pumps. After treatment with miltefosine, ursolic acid, CH8 or quercetin in monotherapy or in combined therapy using the selected EPI, the macrophage infection rate was also determined. PAβN modifies the activity of transporters that efflux substrates, in particular AcrAB type transporters in bacteria, thus enhancing the effect of therapy in most *Leishmania* parasites. In turn, the synergy of VER with the compounds is a consequence of modulation of Pgp pumps. However, ORT may have their functions changed by other compounds, such as quercetin, showing different activities. In addition, the EPI's ability to modulate the pumps responsible for drug efflux varies with the species of *Leishmania*. The addition of EPI to *Leishmania* treatment favors antileishmanial activity of the compounds that are substrates of efflux pumps, as is the case of miltefosine and CH8. This study demonstrates that the use of EPI in polytherapy is a valid option that should be strongly considered. The possible use of EPI can enhance the effect of anti-leishmanial drugs, reducing the concentration of compounds and, consequently the toxicity, therefore preventing the onset of parasite resistance.

Key-words: *Leishmania* spp., efflux, pumps, drugs, MDR

Índice

Publicações e comunicações	i
Agradecimentos	iii
Resumo	vii
Abstract.....	viii
Índice	ix
Índice de figuras.....	xiv
Índice de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas	xvii
I. Introdução.....	1
1. Leishmaniose	1
1.1. Taxonomia.....	1
1.2. Epidemiologia.....	2
1.3.1. Manifestações clínicas em humanos	2
1.3.2. Manifestações clínicas em cães	3
1.4. Distribuição geográfica	3
1.5. Morfologia e ciclo de vida do parasita	4
1.5.1. Fases de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado	5
1.5.2. Fases de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado	6
1.5.3. Ciclo de vida.....	6
1.6. Interação do parasita com o hospedeiro vertebrado	7
1.7. Diagnóstico.....	8
1.8. Tratamento.....	10
1.9. Outras estratégias de controlo	11
2. Resistência a fármacos antileishmania	11

2.1. Mecanismos de resistência a fármacos: transportadores ABC	12
2.2. Transportadores ABC de <i>Leishmania</i>	14
2.2.1. Subfamília ABCA	15
2.2.2. Subfamília ABCB	15
2.2.3. Subfamília ABCC	16
2.2.4. Subfamília ABCG	17
2.3. Estratégias para controlar a resistência aos fármacos	17
2.3.1. Inibidores dos transportadores ABC	18
3. Novos compostos	19
3.1. Triterpenos: ácido ursólico e ácido oleanólico	20
3.2. Flavonóides: chalconas e quercetina.....	20
3.2.1. Chalcona CH8	20
3.2.2. Quercetina	21
Objetivos	22
II. Material e Métodos	24
1. Macrófago	24
1.1. Cultura da linha celular P388D1	24
2. Parasitas.....	24
2.1.1. <i>Leishmania (L.) infantum</i>	24
2.1.2. <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	25
2.1.3. <i>Leishmania (V.) shawi</i>	25
2.1.4. <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	26
2.2. Cultura de promastigotas axénicos	26
2.3. Cultura de amastigotas axénicos.....	26
2.4. Visualização das formas promastigota e amastigota	26
2.4.1. Preparação das amostras	26

2.4.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento	27
3. Avaliação em tempo real da atividade de efluxo em macrófagos e parasitas do género <i>Leishmania</i>	27
3.1. Método fluorimétrico semi-automático em tempo real	27
3.1.1. Preparação das amostras.....	28
3.1.2. Determinação da concentração de EtBr	28
3.1.3. Inibidores de bombas de efluxo (EPI).....	29
3.1.4. Ensaio de acumulação de EtBr	30
3.1.5. Análise estatística	31
4. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania dos EPI.....	31
4.1. Macrófagos	32
4.1.1. Otimização do ensaio de citotoxicidade	32
4.1.2. Avaliação da citotoxicidade dos EPI	33
4.2. Parasitas do género <i>Leishmania</i>	33
4.2.1. Otimização do ensaio de citotoxicidade	33
4.2.2. Avaliação da atividade antileishmania dos EPI.....	34
4.3. Determinação do índice de seleção dos EPI.....	34
5. Internalização de fármacos clássicos e novos compostos com atividade antileishmania	35
5.1. Avaliação da citotoxicidade dos fármacos clássicos e dos novos compostos.....	35
5.2. Avaliação da atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos	36
6. Internalização de fármacos clássicos e novos compostos por macrófagos parasitados por <i>Leishmania</i> spp.	37
6.1. Otimização da infeção da linha celular P388D1	37
6.1.1. Infeção da linha celular P388D1	37
6.2. Tratamento de macrófagos infetados com fármacos clássicos e novos compostos em conjugação com EPI.....	38

6.3. Determinação da taxa de infecção após tratamento com EPI e fármacos	39
6.3.1. Natureza das interações entre os compostos e os EPI.....	40
6.4. Análise Estatística.....	40
III. Resultados	42
1. Formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i> spp.....	42
2. Avaliação em tempo real da atividade de efluxo em macrófagos e parasitas do género <i>Leishmania</i>	42
2.1. Determinação da concentração de EtBr.....	42
2.2. Ensaio de acumulação de EtBr em macrófagos.....	43
2.3. Acumulação de EtBr em parasitas do género <i>Leishmania</i>	45
2.3.1. Sub-género <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ).....	45
2.3.2. Sub-género <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	48
3. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania dos EPI	54
3.1. Otimização do ensaio de viabilidade em macrófagos.....	54
3.1.1. Avaliação da citotoxicidade dos EPI.....	58
3.2. Otimização do ensaio de viabilidade em parasitas do género <i>Leishmania</i>	59
3.2.1. <i>L. infantum</i>	59
3.2.2. <i>L. amazonensis</i> (HOM).....	61
3.2.3. <i>L. amazonensis</i> (PH)	63
3.2.4. <i>L. shawi</i>	65
3.2.5. <i>L. guyanensis</i>	67
3.3. Avaliação da atividade antileishmania dos EPI.....	69
3.3.1. Sub-género <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ).....	69
3.3.2. Sub-género <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	70
3.3.3. Sub-género <i>Viannia</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	72
3.4. Determinação do índice de seleção dos EPI	73

4. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos.....	74
4.1. Níveis de citotoxicidade de fármacos clássicos e de novos compostos com atividade antileishmania.....	74
4.2. Atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos	75
4.3. Índice de seleção (IS) de fármacos clássicos e novos compostos	76
5. Caracterização da internalização de fármacos clássicos e novos compostos por macrófagos parasitados por <i>Leishmania</i> spp.	77
5.1. Infecção de macrófagos	77
5.1.1. <i>L. infantum</i>	77
5.1.2. <i>L. amazonensis</i> (HOM)	78
5.1.3. <i>L. amazonensis</i> (PH).....	79
5.1.4. <i>L. shawi</i>	81
5.1.4. <i>L. guyanensis</i>	82
5.2. Efeito da associação de EPI com fármacos clássicos e novos compostos na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	84
5.2.1. Sub-gênero <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ)	84
5.2.2. Sub-gênero <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	86
5.2.3. Sub-gênero <i>Viannia</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	87
IV. Discussão e Conclusões.....	94
V. Referências Bibliográficas	103

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática da forma promastigota do parasita.	5
Figura 2: Representação esquemática da forma amastigota do parasita.	6
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	8
Figura 4: Estrutura dos transportadores ABC.	14
Figura 5: Formas promastigota e amastigota de <i>L. infantum</i> e de <i>L. amazonensis</i> (PH).	42
Figura 6: Curvas de acumulação de EtBr no interior de macrófagos.	43
Figura 7: Acumulação de EtBr em macrófagos.	45
Figura 8: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas avirulentos de <i>L. infantum</i> tratados com EPI.	47
Figura 9: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas virulentos de <i>L. infantum</i> tratados com EPI.	48
Figura 10: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas da estirpe HOM de <i>L. amazonensis</i> tratados com EPI.	50
Figura 11: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas da estirpe PH de <i>L. amazonensis</i> tratados com EPI.	51
Figura 12: Acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas de <i>L. shawi</i> tratados com EPI.	53
Figura 13: Acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas de <i>L. guyanensis</i> tratados com EPI.	53
Figura 14: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 24h.	55
Figura 15: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 48h.	56
Figura 16: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 72h.	57
Figura 17: Níveis de viabilidade de promastigotas de <i>L. infantum</i> incubados durante 24h.	60
Figura 18: Níveis de viabilidade em promastigotas da estirpe HOM de <i>L. amazonensis</i> incubados durante 24h.	62
Figura 19: Níveis de viabilidade em promastigotas da estirpe PH de <i>L. amazonensis</i> incubados durante 24h.	64

Figura 20: Níveis de viabilidade em promastigotas de <i>L. shawi</i> incubados durante 24h.	66
Figura 21: Níveis de viabilidade em promastigotas de <i>L. guyanensis</i> incubados durante 24h.	68
Figura 22: Infecção de macrófagos por promastigotas virulentos de <i>L. infantum</i>	78
Figura 23: Infecção de macrófagos por promastigotas da estirpe HOM de <i>L. amazonensis</i>	79
Figura 24: Infecção de macrófagos por promastigotas da estirpe PH de <i>L. amazonensis</i>	80
Figura 25: Infecção de macrófagos por promastigotas de <i>L. shawi</i>	81
Figura 26: Infecção de macrófagos por promastigotas de <i>L. guyanensis</i>	83
Figura 27: Fagocitose de <i>L. guyanensis</i> por macrófagos P388D1.	83
Figura 28: Efeito da associação de EPI com a miltefosina na infecção por <i>L. infantum</i> .85	
Figura 29: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infecção com a estirpe HOM de <i>L. amazonensis</i>	86
Figura 30: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infecção por <i>L. shawi</i>	88
Figura 31: Efeito da associação de EPI com quercetina na infecção por <i>L. shawi</i>	89
Figura 32: Efeito da associação de EPI com ácido ursólico na infecção por <i>L. shawi</i> . ..	90
Figura 33: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infecção por <i>L. guyanensis</i>	91
Figura 34: Efeito da associação de EPI com CH8 na infecção por <i>L. guyanensis</i>	92

Índice de tabelas

Tabela 1: EPI moduladores de MDR e inibidores de Pgp	19
Tabela 2: Concentrações dos EPI utilizadas nos ensaios de acumulação de EtBr.....	30
Tabela 3: Concentrações mínimas e máximas dos EPI utilizadas na determinação da citotoxicidade e eventual atividade antileishmania.	32
Tabela 4: Concentrações mínimas e máximas dos fármacos e novos compostos utilizados na determinação da citotoxicidade e atividade antileishmania.	36
Tabela 5: Concentrações de EPI utilizados no tratamento de amastigotas intracelulares.	38
Tabela 6: Concentrações de fármacos e compostos utilizados no tratamento de macrófagos infectados.....	39
Tabela 7: Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com inibidores de bombas de efluxo (EPI).	44
Tabela 8: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axénicos de <i>L. infantum</i> tratados com EPI.	46
Tabela 9: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axénicos das estirpes HOM e PH de <i>L. amazonensis</i> tratados com EPI.....	49
Tabela 10: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axénicos de <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i> tratados com EPI.....	52
Tabela 11: Determinação da citotoxicidade de EPI em macrófagos.	58
Tabela 12: Determinação da citotoxicidade de EPI em <i>L. infantum</i>	70
Tabela 13: Citotoxicidade de EPI em <i>L. amazonensis</i>	71
Tabela 14: Citotoxicidade dos EPI em <i>L. shawi</i> e <i>L. guyanensis</i>	72
Tabela 15: Índice de seleção dos EPI em promastigotas do subgénero <i>Leishmania</i> e <i>Viannia</i>	73
Tabela 16: Citotoxicidade de fármacos e novos compostos em macrófagos.....	74
Tabela 17: Efeito de fármacos e novos compostos em <i>Leishmania</i> spp.	75
Tabela 18: Índice de seleção de fármacos clássicos e novos compostos.	76

Lista de abreviaturas

×g - força centrífuga relativa

ABC - *ATP-binding cassette*

Amast - amastigota

ATCC - do inglês “*American Type Culture Collection*”

BR - Brasil

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CC₁₀ - 10% da concentração citotóxica

CC₅₀ - 50% da concentração citotóxica

CCCP - Carbonyl cyanide m-chlorophenylhy-drazone

CH8 - chalcona

CO₂ – dióxido de carbono

DAT - testes de aglutinação direta, do inglês “*direct agglutination test*”

DMSO – dimetilsulfóxido

DMC - 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone

DNA - ácido desoxirribonucleico

DP - desvio padrão

EUA - Estados Unidos da América

ELISA - do inglês “*enzyme-linked immunosorbent assay*”

EPI - inibidor de bombas de efluxo, do inglês “*efflux pump inhibitor*”

EtBr - brometo de etídio

FCT - Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia

FBS - soro fetal bovino, do inglês “*fetal bovine serum*”

FEDER - Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

Fig. - Figura

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GSH – glutathiona

GSH1 - glutamincisteína

HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico

HOM - Homem

IBCCF - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

IC₁₀ - 10% da concentração inibitória

IC₅₀ - 50% da concentração inibitória

ICAQF - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

ICT - testes imunocromatográficos, do inglês “*immunochromatographic test*”

IFA - anticorpos de fluorescência indirecta, do inglês “*indirect fluorescence antibody*”

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IMI - índice mínimo de infecção

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

IR - índice de redução das células parasitadas

IS - índice de seleção

kDNA - DNA do cinetoplasto, do inglês “*kinetoplastic DNA*”

L. - *Leishmania*

LC - leishmaniose cutânea

LCan - leishmaniose canina

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LDA - ensaio de diluição limite, do inglês “*limit dilution assay*”

LLDC- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LPG - lipofosfoglicano

LPMI - Laboratório de Patologia de Moléstias Infeciosas

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LV - Leishmaniose visceral

LVZ - Leishmaniose visceral zoonótica

m/v - massa/volume

MDR - resistência a múltiplos fármacos, do inglês “*multidrug resistance*”

MILT - miltefosina

MRP - do inglês “*multidrug resistance-associated proteins*”

n.d. - não determinado

NaCl - cloreto de sódio

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio

NBD - domínios citosólicos ligados a nucleótidos, do inglês “*cytosolic nucleotide-binding domains*”

OsO₄ - tetróxido de ósmio

OMS/WHO - Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

ORF - do inglês “*open reading frame*”

ORT- Ortovanadato de Sódio

PAβN - Phe-Arg Beta-Naphthylamide

PBS - tampão fosfato salino, do inglês “*phosphate buffered saline*”

PCR - reação de polimerase em cadeia, do inglês “*polymerase chain reaction*”

Pgp - glicoproteína-P, do inglês “*P-Glycoprotein*”

PH – flebotomídeo

PKDL - Leishmaniose dérmica pós-kala azar, do inglês “*Post-kala-azar dermal leishmaniasis*”

PMZ - prometazina

Prom - promastigota

PRP1 - do inglês “*pentamidine resistance protein 1*”

PT - Portugal

PZ - promezina

QUERC - quercetina

r² - valor de correlação linear

RI - índice da redução da infecção

Resazurina - 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido

RPMI - do inglês “*Roswell Park Memorial Institute culture medium*”

SCHN- Schneider

TMD - domínios transmembranares, do inglês “*transmembrane domains*”

TSH - tripanotona

TZ - tioridazina

U - unidades

UFa - unidades arbitrárias de fluorescência

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSP - Universidade Federal de São Paulo

V. - *Viannia*

v/v - volume/volume

VER - Verapamil

VIC - valor indicativo de significância (*cut-off*)

VIH - vírus da imunodeficiência humana

vs - versus

ΣIMI - somatório dos índices mínimos de infecção

I. Introdução

1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma infecção parasitária de mamíferos causada por parasitas protozoários da família Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Merzlyak *et al.*, 2001) e do género *Leishmania* Ross, 1903 (Bañuls *et al.*, 2007) transmitidos por flebotomídeos do género *Phlebotomus* Rondani e Berté, 1843 no Velho Mundo e *Lutzomyia* França, 1924 no Novo Mundo. Clinicamente, esta infecção pode apresentar manifestações viscerais, cutâneas ou mucocutâneas.

A leishmaniose faz parte do conjunto de doenças tropicais negligenciadas. Nas últimas décadas várias descobertas têm sido feitas ao nível da taxonomia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento, tendo-se constatado um acentuado aumento de artigos científicos desde 1957 (Al-Mutawakel *et al.*, 2010).

1.1. Taxonomia

Por observação microscópica, as diferentes espécies de *Leishmania* apresentam características morfológicas idênticas. Por isso, a classificação das diversas espécies de *Leishmania* tem incidido em critérios como a distribuição geográfica (Souza *et al.*, 2012) e as manifestações clínicas (Lucas *et al.*, 1998). No entanto, a análise biomolecular tem demonstrado que padrões de polimorfismo exibidos pelo DNA do cinetoplasto (kDNA) (Hatam *et al.*, 2005) e proteínas (Fraga *et al.*, 2010) são atualmente melhores opções para classificar espécies de *Leishmania* quando comparados com critérios patológicos e geográficos.

Com base na capacidade do parasita se desenvolver no intestino anterior do vetor (suprapilária) ou no intestino médio posterior (peripilária) (Lainson & Shaw 1987) foram diferenciados dois sub-géneros que originam patologia em mamíferos, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), respetivamente. Das 30 espécies de *Leishmania* atualmente conhecidas, pelo menos 20 são responsáveis pelo desenvolvimento de doença em humanos. A maioria das espécies são zoonóticas, afetando mamíferos domésticos ou selvagens.

1.2. Epidemiologia

A Leishmaniose é uma das doenças parasitárias com maior impacto no Mundo, uma vez que apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem 2 milhões de novos casos por ano e 310 milhões de pessoas estão em risco de ser infectadas (WHO, 2013). Estima-se ainda que anualmente ocorram 20 000 a 40 000 mortes por leishmaniose. Dos 1,3 milhões de casos estimados estão actualmente reportados apenas cerca de 600 000 (Alvar *et al.*, 2012).

A co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) tem alterado a epidemiologia da infecção por *Leishmania*. A infecção por VIH aumenta a susceptibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento da doença visceral. Em 2012, 35 países endémicos para leishmaniose reportaram casos de co-infecção com VIH (Alvar *et al.*, 2008).

1.3. Manifestações clínicas

1.3.1. Manifestações clínicas em humanos

O termo Leishmaniose compreende um conjunto de doenças afectas à população humana que apresentam manifestações clínicas distintas consoante a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro (Pintado *et al.*, 2001): leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar e leishmaniose mucocutânea (LMC); existindo ainda leishmaniose dérmica Pós-kala-azar (do inglês *Post-kala-azar dermal leishmaniasis*, PKDL). A LC é a forma clínica mais frequente e caracteriza-se por lesões cutâneas localizadas ou difusas, geralmente de cura espontânea (WHO, 2010). O seu aparecimento é causado por *L. tropica*, *L. major* ou *L. aethiopica* no velho mundo. No novo mundo a leishmaniose tegumentar americana (LTA) deve-se á infecção por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. shawi*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* ou *L. naiffi* (Ashford, 2000). A leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada por *L. aethiopica* ou *L. amazonensis* apresenta-se como uma forma clínica crónica e progressiva, com lesões na pele não ulcerativas. Geralmente está associada a indivíduos co-infectados com VIH ou outros tipos de imunossupressão (WHO, 2010).

A LMC é uma forma progressiva de LC, caracteriza-se pelo aparecimento de lesões secundárias que levam à destruição de cartilagens e mucosas provocando lesões

graves e mutilações nas regiões circundantes (Ashford, 2000; WHO, 2010). Ocorre em casos de infecção por *L. braziliensis*, *L. panamensis* ou *L. guyanensis* (Ashford, 2000). Existem, ainda, alguns casos reportados de LMC provocada por *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Desjeux, 1996).

A LV ocorre por infecção com *L. donovani* e *L. infantum*. Uma vez que o parasita infeta e multiplica-se em órgãos como o baço, fígado e nódulos linfáticos, LV é a forma clínica mais grave e é fatal quando não tratada (WHO, 2010). Caracteriza-se por perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia e febre persistente (Berman, 1997). Apesar da gravidade da forma clínica visceral, em indivíduos adultos imunocompetentes, a infecção por *L. infantum* é geralmente assintomática e com resolução pelo próprio sistema imunitário do indivíduo (Sahni, 2012).

Por fim, mais rara, a PKDL ocorre após o tratamento de LV causada por *L. donovani* (Ashford, 2000).

1.3.2. Manifestações clínicas em cães

LV causada por *L. infantum* é considerada uma zoonose, uma vez que o principal reservatório é o cão e o Homem é infetado acidentalmente (Abranches *et al.*, 1998). A leishmaniose canina (LCan) é uma doença crónica e fatal. Caracteriza-se pelo aparecimento de dermatite, ulcerações da pele, alopecia, lesões oculares, linfadenopatia, perda de peso, epistaxis, diarreia e onicogribose. Em regiões endémicas, o parasita persiste no reservatório, muitas vezes de forma assintomática, e assume um papel crucial na transmissão ao vetor e posteriormente ao Homem (Abranches *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 2011). Vários autores referem outras espécies que foram encontradas em cães domésticos (Llanos-Cuentas *et al.*, 1999; Reithinger & Davies, 1999; Reithinger *et al.*, 2003; Wallis *et al.*, 2012). No entanto na maioria dos casos, não provocam doença no animal.

1.4. Distribuição geográfica

A leishmaniose é um problema global, ocorrendo maioritariamente em zonas tropicais e subtropicais. Está presente em todos os continentes, excepto na Antártida e é prevalente em 98 países (Alvar *et al.*, 2012). A distribuição das diferentes espécies de

Leishmania é geralmente associada a duas sub-divisões geográficas: Novo Mundo (Américas) e Velho mundo (África, Ásia e Europa).

Anualmente ocorrem cerca de 1,3 milhões de novos casos, em que 300 000 são viscerais e 1 milhão são cutâneos ou mucocutâneos. Dos casos viscerais, a maioria (90%) ocorre no Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Relativamente aos casos cutâneos estes ocorrem maioritariamente (70 a 75%) no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irão, Paquistão, Perú, Arábia Saudita, República Árabe, Síria e Tunísia. Os casos mucocutâneos estão geralmente associados a países como o Brasil, Perú e Bolívia (Alvar *et al.*, 2012)

Na Europa, cerca de 700 casos de LC e LV ocorrem por ano na bacia Mediterrânica (Dujardin *et al.*, 2008).

A distribuição da leishmaniose tem-se vindo a modificar desde 1993 e apesar do elevado número de casos que têm sido reportados, em 98 países afectados, o número real de casos não é conhecido (Alvar *et al.*, 2012). Uma das causas para o crescimento do número de casos é a mobilidade das populações que expõe pessoas não imunes ao parasita (Dujardin, 2005).

Em Portugal, tal como no sul da Europa, vários casos de LV e LC têm sido descritos, estando maioritariamente associados a três regiões: Alto Douro, Região Metropolitana de Lisboa e Algarve. Entre 2000 e 2009, 173 novos casos de LV foram diagnosticados, ocorrendo maioritariamente em crianças ou indivíduos com o sistema imunitário comprometido. E cerca de 10 casos de LC ocorrem anualmente em Portugal (Campino & Maia, 2010).

1.5. Morfologia e ciclo de vida do parasita

Os parasitas do género *Leishmania* são digenéticos, ou seja tem duas fases distintas durante o ciclo celular: uma fase extracelular no hospedeiro invertebrado (flebotómídeos) e uma intracelular no hospedeiro vertebrado. Assim sendo, o parasita apresenta duas formas morfológicas distintas durante o ciclo de vida: amastigota e promastigota.

1.5.1. Fases de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado

Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da ordem Díptera e subfamília Phlebotominae. Dos vários géneros descritos, apenas dois tem importância médica: *Phlebotomus* no Velho mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Todos os vetores de *Leishmania* conhecidos são espécies destes dois géneros (Killick-Kendrick, 1999).

Assim como os mosquitos, as fêmeas destes dois géneros, são hematófagas, ou seja, necessitam de uma refeição sanguínea para o desenvolvimento dos ovos. Quando ocorre ingestão de sangue contendo macrófagos infetados com parasitas, inicia-se o desenvolvimento da infecção no vetor invertebrado. As alterações de temperatura e de pH entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado, originam alterações morfológicas, moleculares e de expressão génica no parasita. No intestino médio do hospedeiro intermediário os parasitas desenvolvem-se na forma promastigota (Fig. 1), com formas longas (com 15 a 20 μm por 1,5 a 3,5 μm) e com um flagelo anterior bem desenvolvido (15 a 28 μm) (Herwaldt, 1999; Killick-Kendrick, 1999; Bañuls *et al.*, 2007; Dostálová & Volf, 2012).

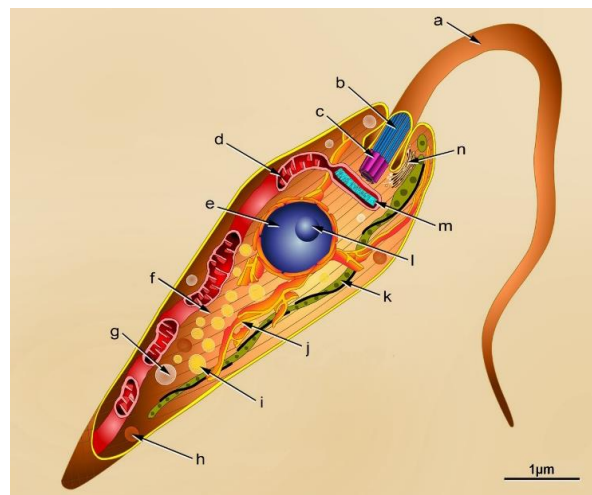


Figura 1: Representação esquemática da forma promastigota do parasita. a - flagelo; b - axonema; c - corpo basal; d - mitocôndria; e - núcleo; f - microtúbulos subpeliculares; g - glicossoma; h - inclusões lipídicas; i - acidocalcissoma; j - retículo endoplasmático; k - túbulo multivesicular; l - nucléolo; m - cinetoplasto; n - complexo de Golgi (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013).

O desenvolvimento da forma promastigota é caracterizado por dois estádios: um estádio procíclico e um estádio metacíclico. Os promastigotas procíclicos não são

I. Introdução

infeciosos, encontram-se em divisão contínua e o seu flagelo é curto. Por sua vez, os promastigotas metacíclicos são infecciosos (Killick-Kendrick, 1990; Ashford, 2000).

1.5.2. Fases de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado

No hospedeiro vertebrado, os parasitas têm a capacidade de parasitar as células do sistema imunitário responsáveis pela eliminação dos agentes invasores do organismo: os macrófagos.

Os parasitas do género *Leishmania* são capazes de estabelecer infecções naturais e são encontrados em diferentes mamíferos: roedores, canídeos, primatas não humanos, entre outros (Lainson & Shaw, 1987). É no hospedeiro vertebrado que a forma amastigota (Fig. 2) do parasita se desenvolve. As formas amastigotas são ovóides, com 2,5 a 5 µm de diâmetro, não possuem flagelo livre, são intracelular obrigatórias e localizam-se nos vacúolos parasitóforos das células fagocíticas do hospedeiro (Bañuls *et al.*, 2007; Dostálová & Volf, 2012).

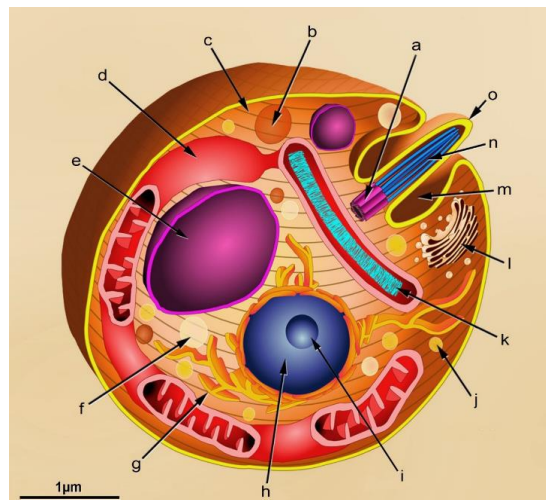


Figura 2: Representação esquemática da forma amastigota do parasita. a - corpo basal; b - inclusões lipídicas; c - microtúbulos subpeliculares; d - mitocôndria; e - megassoma; f - glicossoma; g - retículo endoplasmático; h - núcleo; i - nucléolo; j - acidocalcissoma; k - cinetoplasto; l - complexo de Golgi; m - bolsa flagelar; n - axonema; o - flagelo (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013).

1.5.3. Ciclo de vida

O ciclo de vida (Fig. 3) inicia-se quando uma fêmea infetada realiza uma refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado. Durante a alimentação, o flébotomo transmite o parasita na forma promastigota (promastigota metacíclico) através do probóscide. Na

derme do mamífero, os parasitas são fagocitados por macrófagos, e intracelularmente transformam-se em amastigotas. No interior das células fagocíticas, os amastigotas multiplicam-se por fissão binária, causando ao fim de algum tempo de multiplicação a lise celular, sendo sucessivamente fagocitados por novos macrófagos. Durante uma nova refeição sanguínea num mamífero infetado, os flebótomos ingerem macrófagos infetados. Durante o processo de digestão no intestino médio do invertebrado os amastigotas são libertados, adquirindo a forma promastigota. Após multiplicação dos promastigotas, estes migram para o probóscide do vetor, para durante a refeição sanguínea serem novamente inoculados num hospedeiro vertebrado (Ashford, 2000; Bañuls *et al.*, 2007; Dostálová & Volf, 2012).

1.6. Interação do parasita com o hospedeiro vertebrado

São vários os fatores que interferem na infeção e diferenciação de promastigotas em amastigotas no hospedeiro vertebrado. Após a inoculação de promastigotas metacíclicos no hospedeiro vertebrado, o parasita interage com vários tipos de células, nomeadamente macrófagos e neutrófilos, adquirindo a forma amastigota (Mougneau *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2014).

No mamífero, os promastigotas são rapidamente fagocitados pelos macrófagos (Locksley *et al.*, 1988) alojando-se em vacúolos parasitóforos que se fundem com lisossomas ricos em enzimas proteolíticas formando os fagolisossomas (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Como outros microrganismos intracelulares obrigatórios, *Leishmania* apresenta diversas estratégias para evitar a sua destruição pelo organismo do hospedeiro. Entre elas, destaca-se a capacidade de evitar a degradação no interior dos vacúolos parasitóforos (Duclos & Desjardins, 2000). Este mecanismo é dependente de proteínas de superfície, como o lipofosfoglicano (LPG), que protegem o parasita no ambiente hostil dos fagolisossomas. O parasita tem a capacidade de suprimir a síntese de radicais de oxigénio e outros intermediários de nitrogénio e alterar a produção de óxido nítrico no interior dos fagolisossomas (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Outra estratégia é a elevada atividade enzimática dos amastigotas capazes de eliminar radicais oxidativos. Para além disso tem também capacidade de inativar as enzimas lisossomais e manter o pH favorável à sua perfeita adaptação ao interior do fagolisossoma (Meshnick & Eaton, 1981; Bogdan *et al.*, 1990; Bogdan & Röllinghoff, 1998).

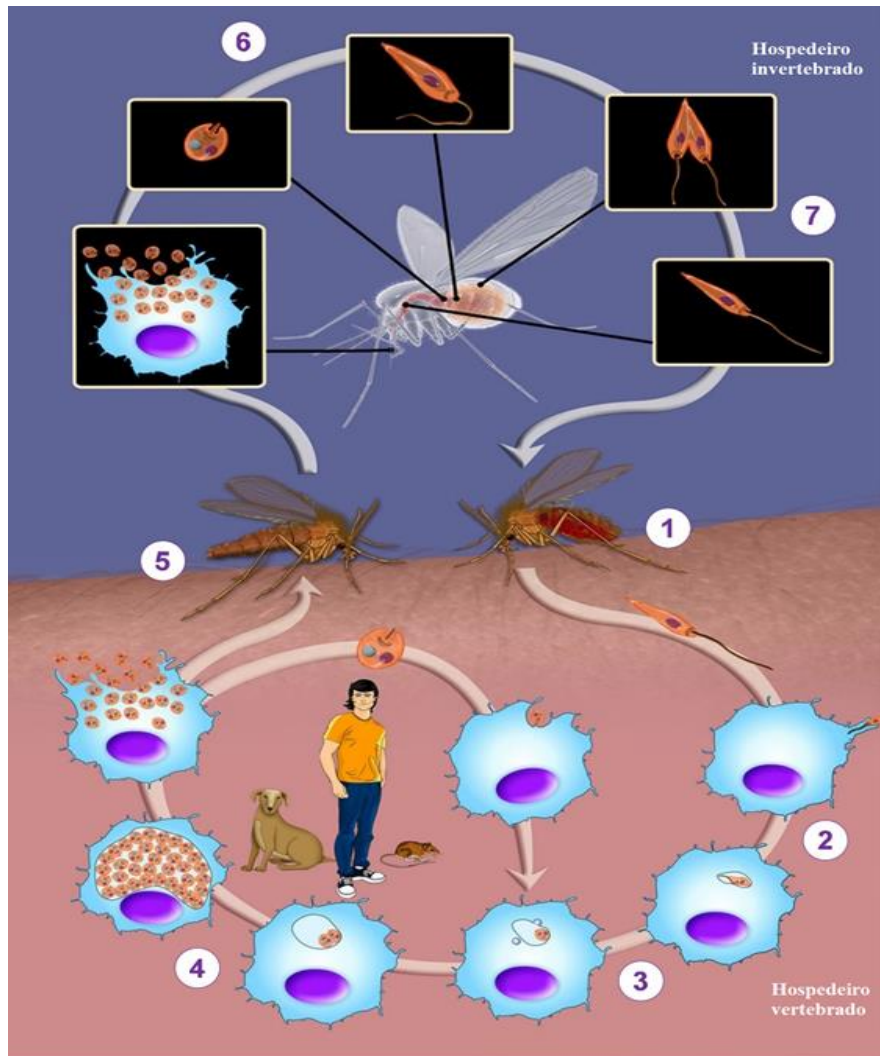


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1 - A fêmea flebotomídea inocula promastigotas no hospedeiro vertebrado durante a refeição sanguínea; 2 - Os promastigotas são fagocitados por células fagocitárias; 3 - No interior do vacúolo parasitóforo dos macrófagos o promastigota adquire a forma amastigota; 4 - Multiplica-se por fissão binária, causando a lise celular; 5 - Ingestão de macrófagos parasitados por uma fêmea flebotomídea durante a refeição sanguínea; 6 - No intestino médio, os amastigotas transformam-se em promastigotas; 7 - Multiplicam-se e migram para o probóscide (Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico de leishmaniose é crucial, pois a toxicidade e o preço elevado dos fármacos obriga a que a infecção seja confirmada antes de iniciar o tratamento. O teste de diagnóstico deve idealmente ter alta especificidade e sensibilidade e se possível distinguir entre a fase aguda de doença e a infecção assintomática (Chappuis *et al.*, 2007).

Em regiões endêmicas ou em picos epidêmicos, o diagnóstico das três principais formas clínicas (LV, LC e LMC) é realizado com base em sintomas e sinais. Mas a confirmação do diagnóstico de qualquer uma das formas de leishmaniose depende da demonstração da presença de amastigotas nos tecidos infetados, quer por microscopia, quer por cultura do parasita. A confirmação é realizada recorrendo a biópsias da pele, aspirados da medula óssea, nódulos linfáticos ou baço (Ashford, 2000). No entanto, apesar de a microscopia ser altamente específica a sua sensibilidade é reduzida (Chappuis *et al.*, 2007).

Vários testes que detetam anticorpos específicos antileishmania têm sido desenvolvidos. No entanto, todos apresentam duas limitações: os níveis de anticorpos no soro mantêm-se após o tratamento e indivíduos saudáveis que vivem em regiões endêmicas podem apresentar anticorpos antileishmania. Técnicas como ELISA, *western blot* e fluorescência indireta (IFA) têm-se mostrado importantes para complementar as técnicas parasitológicas (Chappuis *et al.*, 2007).

Mais recentemente, testes de aglutinação direta (DAT) e imunocromatográficos (ICT) que utilizam o antígeno recombinante k39 foram desenvolvidos especificamente para diagnóstico de LV e apresentam elevada sensibilidade e especificidade (Srivastava *et al.*, 2012; Matlashewski *et al.*, 2013). Um novo teste que deteta a proteína de fusão k28 foi recentemente desenvolvido, apresentando elevada sensibilidade e especificidade nos resultados preliminares, podendo vir a ser um bom teste para o diagnóstico de infeção por *Leishmania* (Pattabhi *et al.*, 2010). Por sua vez, no diagnóstico de LC tem sido utilizado o teste de Montenegro, que consiste na inoculação intradérmica de antígeno de culturas de *Leishmania* e verificação do desenvolvimento de hipersensibilidade imunológica após 48 h. Apesar da elevada sensibilidade e especificidade, este teste não permite diferenciar entre infeções assintomáticas e resolvidas (Gontijo, 2003).

Apesar de invasiva na LVZ, a técnica de PCR apresenta-se como a melhor forma de diagnóstico laboratorial. Além de sensibilidade e especificidade superior, quando comparada com técnicas convencionais de diagnóstico de LV e LC (Bensoussan *et al.*, 2006; Antinori *et al.*, 2007), esta técnica permite fazer o diagnóstico independentemente da espécie do parasita, mesmo em baixas concentrações (Reithinger & Dujardin, 2007).

1.8. Tratamento

Os antimoniais pentavalentes: antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) foram durante mais de 70 anos os fármacos de primeira linha para o tratamento de LV (Croft & Olliaro, 2011). No entanto, os antimoniais pentavalentes apresentam diversos efeitos secundários, nomeadamente uma elevada toxicidade (Chappuis *et al.*, 2007). Outras desvantagens destes fármacos são: a administração parental inviabilizada em países em desenvolvimento, a elevada duração do tratamento, eficácia variável entre LV e LC e o possível desenvolvimento de resistências (Herwaldt, 1999; Croft & Coombs, 2003; Piscopo & Azzopardi, 2007).

Apesar de geralmente ser considerado um fármaco de segunda linha, em determinadas áreas do globo, em que o tratamento com antimoniais não é eficaz, a anfotericina B apresenta-se como um fármaco de primeira linha (Croft & Olliaro, 2011). No entanto, esta opção também tem toxicidade elevada, além de ser bastante dispendiosa e de o esquema de tratamento ser complexo (Chappuis *et al.*, 2007).

Dados os elevados custos e efeitos adversos dos fármacos de primeira linha, novas formulações foram estudadas e identificadas. Nomeadamente, a anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]) que se apresenta menos tóxica do que a fórmula tradicional e é inclusive utilizada como fármaco de primeira linha no tratamento de LV na Europa (Bern *et al.*, 2006). No entanto, em áreas endémicas o seu custo é dificilmente suportado (Antinori *et al.*, 2012).

A miltefosina (Impavido[®] para uso humano e Milteforan[®] de uso veterinário) foi inicialmente desenvolvida como um fármaco para doenças oncológicas e é o primeiro fármaco de administração oral para o tratamento de leishmaniose (Soto *et al.*, 2001). Apesar de menos tóxica que os antimoniais pentavalentes, a miltefosina é tetrogénica e não deve ser administrada a mulheres grávidas (WHO, 2010).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo com atividade antileishmania (Croft & Olliaro, 2011). Este fármaco pode ser utilizado individualmente ou combinado com o stibogluconato de sódio (WHO, 2010). Além da inoculação intramuscular, existe também uma formulação tópica para LC (Kim *et al.*, 2009). Quando comparada com outros fármacos a paromomicina apresenta um custo reduzido (Chappuis *et al.*, 2007).

A utilização de pentaminidina (Pentacarinat[®]) tem sido limitada pelos seus efeitos adversos (WHO, 2010). No entanto, é usada como fármaco de segunda linha para o tratamento de LV e LC, quando os antimoniais se provam ineficazes (Croft & Coombs, 2003).

Relativamente ao tratamento de LC, além da paromomicina para uso tópico, como anteriormente referido, e os antimoniais, também o cetoconazol (Saenz *et al.*, 1990) e fluconazole (Zvulunov *et al.*, 2002) apresentam atividade leishmanicida.

O imiquimod e alopurinol são também utilizados no tratamento de LC. Apesar de não possuir atividade antileishmania, o Imiquimod, um imunomodulador tópico, demonstrou ser efetivo em combinação com o antimoniato de meglumina quando o tratamento é ineficaz unicamente com o antimonial (Arevalo *et al.*, 2001). O alopurinol tem também a capacidade de aumentar o efeito dos fármacos antimoniais (Martinez & Marr, 1992). A terapêutica combinada surge como uma alternativa à dificuldade em obter novos fármacos com atividade leishmanicida, incrementando a eficácia do tratamento, reduzindo o desenvolvimento de resistências aos fármacos, diminuindo a duração e o custo do tratamento (Bryceson, 2001; Chappuis *et al.*, 2007).

1.9. Outras estratégias de controlo

O controlo da leishmaniose passa essencialmente por reduzir o contacto dos vetores com os hospedeiros. Uma estratégia possível incide na utilização de inseticidas em *spray*, ou o uso de repelentes, diminuindo a possibilidade de ser infetado pelo parasita (Sharma & Singh, 2008). Outras estratégias possíveis estão associadas ao uso de coleiras inseticidas ou inseticidas de uso tópico pelos reservatórios domésticos (Davies *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de vacinas parece ser a melhor estratégia para controlar as leishmanioses. Após a recente introdução de vacinas para LCan na Europa e no Brasil, espera-se a diminuição da transmissão do parasita e a redução da prevalência de LCan.

2. Resistência a fármacos antileishmania

Os parasitas possuem um elevado número de estratégias que estão na origem da resistência a múltiplos fármacos, nomeadamente: o efluxo ativo, a captação reduzida, as

alterações do alvo de membrana, a capacidade de modificação, inativação e excreção do fármaco e a competição pelo substrato (Ouellette, 2001). Estas estratégias de resistência a fármacos são atualmente o principal problema no controlo de parasitas do género *Leishmania*. A resistência aos fármacos clássicos compromete não só a sua eficácia, mas também a eficácia dos novos compostos, devido à emergência de resistência dos parasitas (Jones & George, 2005).

Como anteriormente descrito, os antimoniais pentavalentes têm sido a primeira escolha no tratamento da leishmaniose. No entanto, a resistência aos antimoniais é um problema grave que têm sido amplamente descrito (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Singh, 2006; Ashutosh *et al.*, 2007; Jeddi *et al.*, 2011; Decuypere *et al.*, 2012). Diversos estudos *in vitro* têm identificado os transportadores ABC como os responsáveis pelo acentuado desenvolvimento de resistência a antimoniais pentavalentes (Légaré *et al.*, 2001; Ouellette *et al.*, 2001; Fadili *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2008).

Apesar de clinicamente a resistência a fármacos de segunda linha não ter a proporção da resistência aos antimoniais, a resistência à pentamidina (Coelho *et al.*, 2007), à anfotericina B (Brotherton *et al.* 2014), ao cetoconazol (Andrade-Neto *et al.*, 2012), à paramomicina (Bhandari *et al.*, 2014) e à miltefosina (Castanys-Muñoz *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2012) já foi demonstrada *in vitro*. A resistência aos fármacos existentes e a dificuldade em obter novas formulações eficazes no tratamento das leishmanioses remete para um grave problema de controlo desta infeção parasitária.

2.1. Mecanismos de resistência a fármacos: transportadores ABC

A superfamília dos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) é uma das maiores famílias de proteínas em procariotas e eucariotas. Os transportadores ABC estão implicados na resistência a fármacos em diversos filós. Estão também envolvidos em diversos processos celulares como a manutenção da homeostase osmótica, o transporte de diversas moléculas através da membrana, o processamento de antigénios, a divisão celular, a reparação do DNA, a tradução e a regulação da expressão génica (Higgins, 1992; Dassa & Bouige, 2001; Sauvage *et al.*, 2009). A distribuição ubíquitosa e origem primordial reflete a importância da homeostase celular na importação e concentração de nutrientes essenciais, na exportação de toxinas adquiridas do ambiente ou produzidas

metabolicamente. Enquanto as bactérias utilizam os transportadores ABC para importar e exportar substâncias, os eucariotas utilizam-nos apenas para exportar (Saurin *et al.*, 1999). Em eucariotas, a maioria das proteínas ABC (Fig. 4) são transportadores que compreendem quatro domínios estruturais: dois domínios transmembranares (do inglês *transmembrane domains*, TMD) e dois domínios citosólicos ligados a nucleótidos (do inglês *cytosolic nucleotide-binding domains*, NBD) (Higgins *et al.*, 1988; Jones & George, 2005). Os NBD contêm os motivos de consenso Walker A e B altamente conservados para a ligação de ATP e o motivo de aminoácidos “LSGGQ”, que é reconhecida como a sequência de assinatura que distingue estas proteínas de outras ATPases (Walker *et al.*, 1982). Os TMD formam o canal de membrana e contêm os locais de ligação ao substrato (Fig. 4) e os NBD são os motores moleculares que utilizam a energia química potencial do ATP em alterações conformacionais necessárias à condução do influxo ou efluxo de moléculas de substrato (Schneider & Hunke, 1998).

Devido à sua elevada atividade no tráfego de moléculas através da membrana, os transportadores ABC estão também envolvidos no fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (do inglês *multidrug resistance*, MDR) em diversos microrganismos e em mamíferos. São diversos os mecanismos que poderiam explicar o aumento da atividade dos transportadores ABC que estão na origem da resistência a diversos compostos. Entre estes, destacam-se o possível aumento da quantidade de proteínas ABC devido à amplificação de genes ou a sobreexpressão e/ou mutações pontuais na sequência genómica (Sauvage *et al.*, 2009).

Com base na similaridade da estrutura dos genes, a ordem dos domínios, e a homologia da sequência dos domínios NBD e TMD, as proteínas ABC de eucariotas podem ser divididas em oito famílias (ABCA a ABCH), sete das quais (ABCA a ABCG) são encontradas nos genomas humano. Das famílias de transportadores ABC em humanos, ABCB (subfamília glicoproteína-P, do inglês *P-Glycoprotein*, Pgp), ABCC (subfamília MRP, do inglês *multidrug resistance-associated proteins*) e ABCG (ABCG2) estão associadas ao fenótipo MDR em células cancerígenas. Estas proteínas ABC

aumentam a resistência aos fármacos por incremento do efluxo da célula, diminuindo a concentração intracelular efetiva de fármaco (Sauvage *et al.*, 2009).

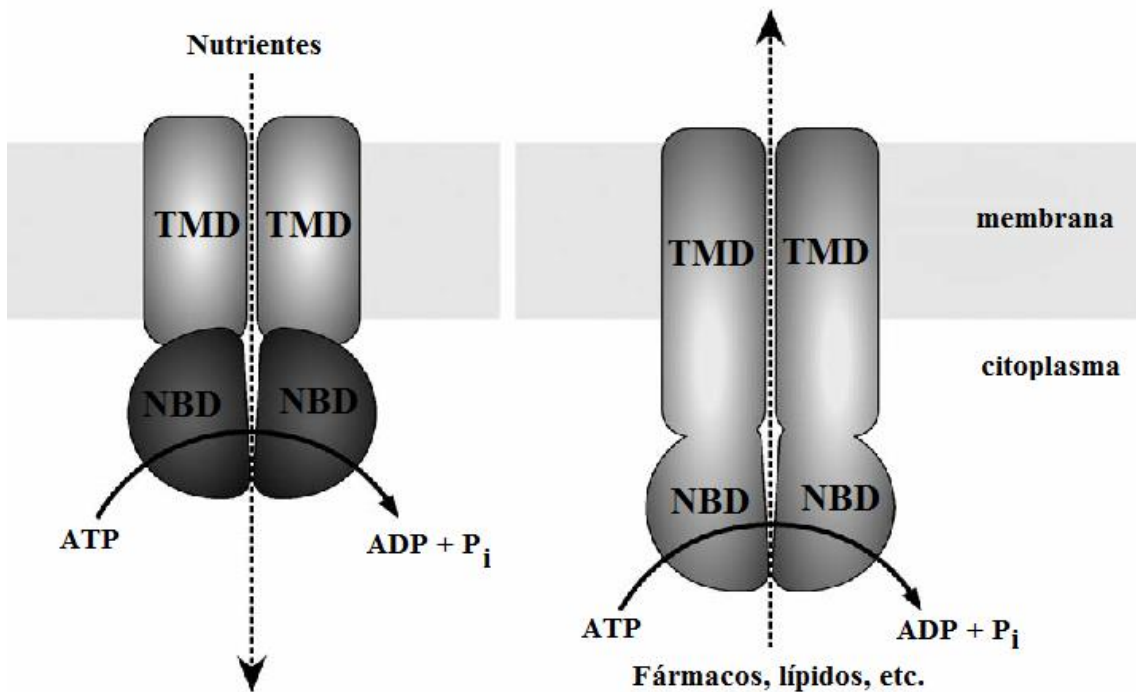


Figura 4: Estrutura dos transportadores ABC. A maioria das proteínas *ATP-binding cassette* (ABC) são transportadores que compreendem quatro domínios estruturais: dois domínios transmembranares (do inglês *transmembrane domains*, TMD) e dois domínios citosólicos ligados a nucleótidos (do inglês *cytosolic nucleotide-binding domains*, NBD). Os TMD formam o canal de membrana e contêm os locais de ligação ao substrato e os NBD são os motores moleculares que utilizam a energia química potencial do ATP em alterações conformacionais necessárias à condução do influxo ou efluxo de moléculas de substrato (Adaptado de Locher, 2009).

2.2. Transportadores ABC de *Leishmania*

Através de um estudo detalhado do genoma de *L. infantum* e *L. major* foi possível identificar por completo a família das proteínas ABC em *Leishmania*. Das 42 ORF (do inglês *open reading frames*) identificadas, 32 codificam transportadores ABC e as restantes codificam para proteínas ABC sem TMD (Leprohon *et al.*, 2006). Os parasitas do género *Leishmania* apresentam maior expansão dos genes ABCA, ABCC e ABCG. Várias ORF homólogas foram também encontradas em *T. brucei* e *T. cruzi*. Comparativamente, *Leishmania* é um dos parasitas com maior número de proteínas ABC (Sauvage *et al.* 2009).

2.2.1. Subfamília ABCA

L. major e *L. infantum* possuem 10 proteínas homólogas com a família ABCA de mamíferos (ABCA1 – ABCA10). Dois genes ABCA em *L. major* e *L. infantum* que codificam as proteínas ABCA4 e ABCA8 (Leprohon *et al.*, 2006) possuem homólogos no genoma de *L. tropica*. ABCA8 localiza-se na região da bolsa flagelar e na membrana plasmática enquanto ABCA4 se encontra na bolsa flagelar e nas vesículas internas. Estas proteínas estão envolvidas no tráfego de fosfolípidos que pode resultar em modificações de superfície para moléculas específicas, algumas das quais envolvidas na infetividade do parasita (Parodi-Talice, 2003; Araújo-Santos *et al.*, 2005).

2.2.2. Subfamília ABCB

No genoma de *Leishmania* foram também identificados quatro genes pertencentes à família ABCB. ABCB4 (MDR1) e ABCB2 (MDR2) são homólogos da Pgp, enquanto a função das proteínas ABCB1 e ABCB3 ainda não é conhecida.

Em cinco estirpes de *Leishmania* resistentes à vinblastina (Henderson *et al.*, 1992; Chow *et al.*, 1993; Gueiros-Filho *et al.*, 1995) ou daunorubicina (Chiquero *et al.*, 1998) foi identificada, pela primeira vez neste parasita, uma proteína homóloga da Pgp, a ABCB4 (Chiquero *et al.* 1998). Nestas estirpes foi ainda verificado um aumento do efluxo do substrato fluorescente rodamina 123 (Gueiros-Filho *et al.*, 1995), indicando que a resistência aos fármacos ocorre por efluxo (Pérez-Victoria *et al.*, 2001).

Foi também comprovado que *L. mexicana* e *L. donovani* resistentes à pentamidina apresentam mecanismos de transporte e/ou exclusão de pentamidina através da mitocôndria (Mukherjee *et al.*, 2006). Por sua vez, em *L. enrietti*, o número de cópias do gene que codifica a proteína ABCB4 (MDR1) foi também relacionado com a acumulação de pentamidina. Pensa-se ainda que o nível de ferro pode ter um efeito modulador na capacidade de ABCB4 transportar fármacos para um compartimento intracelular que se encontra ligado à mitocôndria (Wong & Chow, 2006). MDR1 parece também estar envolvido na resistência à paramomicina (Bhandari *et al.*, 2014), à miltefosina (Pérez-Victoria *et al.*, 2011) e à anfotericina B (Purkait *et al.*, 2012).

A proteína ABCB2 (MDR2) é o segundo membro da família ABCB, homóloga da Pgp identificada em *L. amazonensis* (Katakura *et al.*, 2004). Tem 47% de identidade

com a proteína mais proximamente relacionada, ABCB4, que está envolvida na resistência a fármacos (Gueiros-Filho *et al.*, 1995; Katakura *et al.*, 1999). Parasitas geneticamente modificados com sobreexpressão do gene que codifica ABCB2 apresentaram resistência significativa ao 5-fluorouracil, mas não aos substratos de ABCB4 (Katakura *et al.*, 2004).

2.2.3. Subfamília ABCC

A segunda maior família de proteínas ABC em *Leishmania* é a família ABCC com oito membros identificados. Seis dos quais pertencem à subfamília MRP.

ABCC3 (PGPA ou MRPA) foi o primeiro gene a ser identificado e localiza-se no DNA extracromossômico, no círculo H de promastigotas de *L. tarentolae* (Ouellette *et al.*, 1990) e *L. major* (Callahan & Beverley, 1991). ABCC3 é frequentemente amplificada em parasitas do gênero *Leishmania* resistentes ao antimonial e a fármacos que contêm arsenite (Callahan & Beverley, 1991; Haimeur *et al.*, 2000). Um transportador MDR-like foi também identificado em isolados clínicos de *L. donovani* que aparentemente desenvolveram resistência a antimoniais (Singh *et al.*, 2007). O nível de resistência conferido por ABCC3 varia consoante as espécies de *Leishmania* conduzindo à hipótese de que ABCC3 depende de outros fatores para conferir elevados níveis de resistência, podendo esses fatores variar de espécie para espécie (Pérez-Victoria *et al.*, 2001). ABCC3 localiza-se na membrana vesicular intracelular junto à bolsa flagelar, pelo que é possível que esta proteína confira resistência por sequestração de conjugados de metal-tiol (Légaré *et al.*, 2001). MRPA está também envolvido na resistência à paramomicina (Bhandari *et al.*, 2014).

Outros quatro membros da família ABCC estão igualmente identificados em *Leishmania*: ABCC2 (PgpB), ABCC1 (PgpC), ABCC5 (PgpD) e ABCC4 (PgpE). No entanto, apenas o homólogo de ABCC4 de *L. tropica* mostrou estar sobreexpresso numa linha celular resistente (Gamarro *et al.*, 1994).

ABCC7, também denominado PRP1 (do inglês *pentamidine resistance protein 1*), foi identificado por conferir resistência à pentamidina quando foi transfetado em promastigotas e amastigotas de *L. major* e de *L. infantum* (Coelho *et al.*, 2003; 2007). Por outro lado, o aumento da expressão de PRP1 não foi observado em *L. amazonensis*

quando a resistência foi gerada por pressão de fármaco (Coelho *et al.*, 2008). Tal como ABCC3, ABCC7 é também uma proteína intracelular relacionada com a endocitose e exocitose (Dodge *et al.*, 2004; Coelho *et al.*, 2006; 2007;), o que coloca a hipótese de que ABCC7 confere resistência sequestrando a pentamidina em vesículas que serão exocitadas através da bolsa flagelar (Coelho *et al.*, 2006).

2.2.4. Subfamília ABCG

A família ABCG é constituída por seis transportadores ABC. Dois dos quais, ABCG4 e ABCG6 codificam proteínas relacionadas com o tráfego fosfolipídico e mecanismos de resistência a fármacos. A sobreexpressão dos transportadores ABCG4 (Castanys-Muñoz *et al.*, 2007) e ABCG6 (Castanys-Muñoz *et al.*, 2008) representa resistência à miltefosina em *L. infantum*, enquanto a sobreexpressão do transportador ABCG6 está envolvido na resistência à captotecina em *L. donovani* (BoseDasgupta *et al.*, 2008). Ambas as proteínas localizam-se na membrana plasmática e região da bolsa flagelar do parasita (Castanys-Muñoz *et al.*, 2007; 2008). Não obstante, ABCG2 está também relacionada com a infetividade do parasita (Campos-Salinas *et al.* 2013).

Foi ainda demonstrado que a expressão dos genes dos transportadores ABC pode ser diferente consoante a forma do parasita: ABCA3 e ABCG3 estão preferencialmente expressos na forma amastigota, enquanto ABCF3 predomina em promastigotas (Leprohon *et al.*, 2006). Além dos membros das famílias ABCD (3), ABCE (1), ABCF (3) e ABCH (3) existem três proteínas ainda não caracterizadas em *Leishmania*. ABCI14, o último transportador identificado e caracterizado, aparentemente encontra-se envolvido no efluxo de antimoniais (Manzano *et al.*, 2013).

2.3. Estratégias para controlar a resistência aos fármacos

Devido à emergente resistência aos fármacos clássicos utilizados no tratamento das leishmanioses é necessário monitorizar a evolução da resistência, supervisionar os níveis de adequação e sucesso da terapia com os fármacos disponíveis, diminuir os custos da terapêutica, aumentar o seu acesso e desenvolver métodos de diagnóstico não invasivos que permitam monitorizar a resistência (Croft *et al.*, 2006). A terapêutica combinada parece ser também uma estratégia para o tratamento de LV e LC, uma vez que não só previne a resistência aos fármacos, como promove o sinergismo entre compostos,

diminui as doses necessárias e consequentemente a toxicidade, duração e custo do tratamento e aumenta o espectro de atividade (Croft *et al.*, 2006; Pérez-Victoria *et al.*, 2011; Santarem *et al.*, 2014).

Dada a envolvimento comprovada dos transportadores ABC no desenvolvimento de resistências aos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose é prioritário encontrar compostos que não sejam substratos de transportadores associados ao fenótipo de MDR e que tenham outros alvos (Balaña-Fouce *et al.*, 2014).

Outra solução que tem vindo a ser estudada é o desenvolvimento de compostos capazes de inibir ou modular a atividade das bombas de efluxo do parasita (Croft *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007), dado que competem pelo local de ligação do fármaco aos TMD (Ambudkar *et al.*, 1999). A melhor estratégia para prevenir a emergência de resistências seria um largo espectro de compostos com diferentes alvos e sem resistência cruzada (Croft *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2009; Antinori *et al.*, 2012).

2.3.1. Inibidores dos transportadores ABC

O uso de inibidores de bombas de efluxo (do inglês *efflux pump inhibitors*, EPI) tem sido estudado com o intuito de potenciar a atividade de antibióticos. O desenvolvimento destes compostos tem como principal objetivo diminuir o nível de resistência intrínseca, reverter a resistência adquirida e promover o decréscimo do fenótipo MDR (Lomovskaya & Watkins, 2001). Além de reverterem ou modularem a atividade dos transportadores, os EPI podem também ser substratos das bombas que inibem (Li & Nikaido, 2009). Vários trabalhos em parasitas do género *Leishmania* têm utilizado EPI para caracterizar o envolvimento dos transportadores ABC na resistência aos fármacos clássicos existentes (Essodaïgui *et al.*, 1999; Mandal *et al.*, 2009; Shokri *et al.*, 2012). A tabela 1 ilustra alguns dos compostos conhecidos com capacidade de inibir bombas que provocam o efluxo de fármacos e, consequentemente, revertem o fenótipo MDR. São também descritos alguns EPI que inibem as bombas Pgp como forma de alterar o fenótipo MDR.

Apesar dos resultados verificados na inibição e caracterização de bombas de efluxo associadas ao fenótipo MDR utilizando EPI, a utilização destes moduladores na clínica é dificultada pela reduzida efetividade dos inibidores de primeira geração, como

por exemplo o verapamil. Os inibidores de segunda geração, derivados dos compostos iniciais, potenciam a atividade inibitória e apresentam toxicidade reduzida. Por sua vez, os compostos de terceira geração têm menor toxicidade e melhor interação com os compostos (Ponte-Sucre, 2007; Yang *et al.*, 2008). Compostos fitoquímicos, com baixa toxicidade, estão ainda a ser explorados sendo classificados como compostos de quarta geração.

Tabela 1: EPI moduladores de MDR e inibidores de Pgp

Moduladores de MDR	Moduladores de MDR e Inibidores das Pgp
Promazina (Roohparvar <i>et al.</i> , 2007)	Tioridazina (Viveiros <i>et al.</i> ,2008; Spengler <i>et al.</i> , 2014)
Ortovanadato de sódio (Lee <i>et al.</i> , 2003)	Verapamil (Chiquero <i>et al.</i> , 1998; Kaur & Dey, 2000; Spengler <i>et al.</i> , 2014)
Phe-Arg Beta-Naphthylamide (PABN) (Viveiros <i>et al.</i> , 2008; Barreroa <i>et al.</i> , 2014)	Prometazina (Kars <i>et al.</i> , 2008; Pajak <i>et al.</i> ,2005)
Carbonyl cyanide m-chlorophenylhy-drazone (CCCP) (Viveiros <i>et al.</i> , 2008)	Omeprazole (Ponte-Sucre, 2007)
Clorpromazina (Viveiros <i>et al.</i> , 2008)	Reserpina (Lee <i>et al.</i> , 2003)
Quercetina (Roohparvar <i>et al.</i> , 2007)	Cicloporina A (Chiquero <i>et al.</i> , 1998)
Oubaína (Amaral <i>et al.</i> , 2007)	
Probenecid (Bošnjak <i>et al.</i> ,2014)	

3. Novos compostos

Na ausência de vacinas e tendo em conta a elevada toxicidade e reduzida efetividade dos atuais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, é crucial o desenvolvimento de novos compostos com atividade antileishmania.

A pesquisa de novos compostos com atividade antileishmania foca-se atualmente no estudo de compostos utilizados no tratamento de outras doenças e de biocompostos. Diversos compostos com potencial atividade antileishmania têm sido isolados, dos quais

se destacam os alcaloides; as isoquinolinas; e benzoquinolizidinas; os terpenóides, incluindo os triterpenos, esteróides, saponinas, sesquiterpenos e diterpenos; e flavonóides, principalmente isoflavonas e chalconas (Passero *et al.*, 2013).

3.1. Triterpenos: ácido ursólico e ácido oleanólico

O ácido ursólico e oleanólico, dois triterpenos amplamente distribuídos nas plantas, encontram-se em frações bioativas de Asteraceae, *Baccharis dracunculifolia*, *Baccharis uncinella*, *Miconia langsдорffii* e *Pseudelephantopus spicatus*, nas Lamiaceae, *Ocimum sanctum* e *Salvia ciclica* e na Moraceae *Pourouma guianensis*. Estes compostos apresentaram atividade antileishmania em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Passero *et al.*, 2011), *L. donovani* e *L. major* (Begum *et al.*, 2014) e *L. infantum* (Musayeib *et al.*, 2013). Assim como em amastigotas axénicos de *L. amazonensis* (Odonne *et al.*, 2011). Curiosamente, os dois ácidos conjugados revelaram menor atividade quando comparados com os compostos em separado (Peixoto *et al.*, 2011). Na forma amastigota intracelular, estes triterpenos evidenciaram elevada atividade antileishmania (Torres-Santos *et al.*, 2004) enquanto na forma promastigota apresentaram atividade moderada (Tan *et al.*, 2002). Os efeitos citotóxicos destes compostos ainda é um assunto controverso (Torres-Santos *et al.*, 2004; Passero *et al.*, 2011). No entanto, alguns autores identificaram os triterpenos como uma alternativa ao tratamento de LC, uma vez que apresentaram efeito semelhante à terapêutica *in vivo* com anfotericina B (Passero *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2014).

O ácido ursólico revelou maior atividade antileishmania do que o ácido oleanólico (Torres-Santos *et al.*, 2004; Ayub *et al.*, 2014;). E ambos os compostos evidenciaram atividade superior em promastigotas e amastigotas quando comparados com o antimoniato de meglumina (Torres-Santos *et al.*, 2004). O mecanismo de ação destes compostos ainda não está descrito. Sabe-se apenas que a ação é direcionada para a forma amastigotas (Passero *et al.*, 2011).

3.2. Flavonóides: chalconas e quercetina

3.2.1. Chalcona CH8

Várias chalconas e seus derivados têm sido descritas como potenciais compostos antileishmania. Análogos das chalconas apresentaram elevada atividade antileishmania

em promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. enrietti*, sendo que em alguns casos é significativamente superior quando comparada com a pentamidina (Borges-Argáez *et al.*, 2007; Andrighetti-Fröhner *et al.*, 2009; Bello *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2014). Análogos sintéticos de chalcona evidenciaram também elevada atividade em amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *L. braziliensis* (Roussaki *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2014). Sendo que em amastigotas intracelulares de *L. donovani*, algumas chalconas revelaram maior atividade antiparasitária do que a miltefosina (Shivahare *et al.*, 2014). Assim como em alguns casos provaram serem seletivos para promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e mais eficazes do que o fármaco de referencia, Pentostam[®] (Boeck *et al.*, 2006).

Aparentemente a citotoxicidade é variável consoante os análogos. Borges-Argáez *et al.*, (2007) referiram que chalcona 7 apresenta alguma citotoxicidade enquanto outros autores relataram citotoxicidade reduzida em macrófagos por outras chalconas (Hermoso *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2014;). Ensaio *in vitro* revelaram que as chalconas são efetivas no tratamento de LC (Piñero *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2014; Shivahare *et al.*, 2014).

A chalcona 8 (CH8) é um análogo nitrogenado sintetizado a partir da chalcona natural 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone (DMC) isolada da planta *Piper aduncum* (Torres-Santos *et al.*, 1999; Rossi-Bergmann *et al.*, 2012). A DMC parece interferir com a síntese de esteróis específicos de *Leishmania* (Torres-Santos *et al.*, 2009).

Boeck *et al.*, (2006) demonstraram que CH8 apresenta elevada seletividade para promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade reduzida. O mesmo autor provou ainda a efetividade da CH8 *in vivo* e com eficácia superior à do estibogluconato de sódio. Em relação à LV, a atividade de CH8 é extensível a promastigotas de *L. infantum*. Trabalhos realizados pelo nosso grupo determinaram que a CH8 é mais eficaz em promastigotas do que em amastigotas, sendo mais eficaz nas duas formas do que a anfotericina B (Silva, 2014).

3.2.2. Quercetina

A quercetina é um derivado agliconado da quercitrina isolada de *Kalanchoe pinnata* (Muzitano *et al.*, 2006), presente naturalmente em alimentos (Manjolin *et al.*, 2013). Em alimentos e plantas, o flavonóide encontra-se na sua forma glicosilada,

denominada de quercitrina, que ao ser hidrolisada no intestino delgado, origina a quercetina (Crespy *et al.*, 2001). Este flavonóide tem sido descrito como um inibidor do transportador MRP1 em células cancerígenas (Leslie *et al.*, 2001), de bombas de efluxo em fungos (Roohparvar *et al.* 2007) e da arginase em *L. amazonensis* (Silva *et al.*, 2012; Manjolin *et al.*, 2013). A sua ação antiparasitária parece estar relacionada com a alteração de funções da mitocôndria (Fonseca-Silva *et al.*, 2011).

A atividade antiparasitária da quercetina já foi demonstrada em promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (Mitra *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2002; Tasdemir *et al.*, 2006) e de *L. amazonensis* (Montrieux *et al.*, 2014). A eficácia da combinação de quercetina com outros fármacos antileishmania já foi também estudada (Sen *et al.*, 2005). Assim como a associação com outros compostos de forma a prevenir a citotoxicidade (Sem *et al.*, 2007; 2008), uma vez que este flavonóide causa alguns efeitos citotóxicos em macrófagos murinos (Mari *et al.*, 2009; Montrieux *et al.*, 2014). Tasdemir *et al.* (2006) e Muzitano *et al.* (2009) demonstraram também a potencial atividade antiparasitária da quercetina *in vivo*. Um caso clínico foi também tratado com quercetina, tendo revertido as lesões cutâneas, sem aparentemente causar qualquer tipo de toxicidade (Torres-Santos *et al.*, 2003).

Devido a algumas limitações da terapia com quercetina, estratégias como a utilização das nanopartículas têm sido estudadas. O uso de quercetina associada a nanopartículas poderia facilitar a absorção dos compostos, potenciar a sua ação e reduzir a toxicidade (Das *et al.*, 2013).

Objetivos

O conjunto de trabalhos que integram esta dissertação teve como objetivo principal caracterizar a internalização de fármacos antileishmania clássicos e de novos compostos por promastigotas e amastigotas axénicos e de macrófagos parasitados por quatro espécies diferentes de *Leishmania* causadoras de LV e de LTA, identificando vias e mecanismos que privilegiem a destruição do parasita pelos fármacos, minimizando em simultâneo, qualquer ação potencial sobre a célula hospedeira.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

1. Avaliar em tempo real a atividade de efluxo em macrófagos e parasitas do género *Leishmania*

A atividade de efluxo de macrófagos de murganhos, promastigotas e amastigotas axénicos de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* foi analisada através de um método fluorimétrico semi-automático que quantifica a acumulação de EtBr em tempo real, utilizando o termociclador Rotor-Gene 3000.

2. Analisar a citotoxicidade e atividade antileishmania dos EPI

A citotoxicidade da tioridazina, promezina, prometazina, verapamil, ortovanadato de sódio e Phe-Arg Beta-Naphthylamide foi avaliada *in vitro* em macrófagos de murganhos e em promastigotas axénicos de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* utilizando o método da resazurina. A eventual atividade antileishmania e seletividade dos compostos foram também analisadas.

3. Caracterizar a internalização de fármacos clássicos e novos compostos com atividade antileishmania

A citotoxicidade e atividade antileishmania de antimoniato de meglumina, miltefosina, ácido ursólico, CH8, quercetina e a combinação ácido oleanólico e ácido ursólico foram caracterizadas *in vitro*, em macrófagos de murganhos e promastigotas axénicos de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis*, utilizando o método da resazurina. A seletividade dos fármacos clássicos e novos compostos foi também avaliada.

4. Caracterizar a internalização de fármacos clássicos e novos compostos por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp.

Após a infeção de macrófagos de murganhos infetados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. shawi* e *L. guyanensis* e tratamento com fármacos clássicos, novos compostos ou com os compostos em combinação com EPI, a taxa de infeção foi avaliada pelo método da diluição limite (LDA). O eventual estabelecimento de interações entre os compostos foi também analisado.

II. Material e Métodos

1. Macrófago

A linha celular P388D1 (ATCC, EUA) isolada de linfoma de murganho é considerada uma linha celular de linfoblastos com características de macrófago (macrófago-*like*), com elevada capacidade fagocítica e de expressão de moléculas de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (haplótipo *H-2^{d/d}*) (Campos-Neto *et al.*, 1995).

1.1. Cultura da linha celular P388D1

Para cultivar a linha celular P388D1 foi utilizado RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute culture médium*) 1640 (Lonza, Bélgica) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (do inglês *fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich, Alemanha), previamente inativado pelo calor (56 °C durante 30 min), 2 mM de L-glutamina (Merck, Alemanha), 50 U.mL⁻¹ de penicilina (Sigma-Aldrich) e 50 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Os macrófagos foram cultivados em suspensão a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera húmida, tendo sido adicionado meio a cada 2 a 3 dias, de modo a manter uma concentração celular de cerca de 2 × 10⁶ macrófagos.mL⁻¹.

2. Parasitas

No âmbito desta dissertação foram utilizadas três espécies de *Leishmania* que originam a forma clínica cutânea (*L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. shawi*) e uma espécie que origina a forma clínica visceral (*L. infantum*). Sendo ainda de referir que foram utilizadas duas estirpes distintas de *L. amazonensis* e de *L. infantum* foram utilizados promastigotas virulentos e avirulentos.

2.1. Estirpes de parasitas

2.1.1. *Leishmania (L.) infantum*

L. (L.) infantum (MCAN/PT/2012/IMT0005SG) foi isolada de um caso de leishmaniose canina (LCan) ocorrido no município do Seixal, Setúbal, Portugal e mantido em murganhos BALB/c por passagens sucessivas. Promastigotas virulentos, isolados do baço de murganhos infetados, foram mantidos até à quarta passagem em cultura,

inclusive. Por sua vez, promastigotas com seis ou mais passagens foram utilizados como parasitas avirulentos (Santos-Gomes & Abranches 1996; Moreira *et al.*, 2012).

2.1.2. *Leishmania (L.) amazonensis*

Em todos os ensaios descritos nesta dissertação foram utilizadas duas estirpes da espécie *L. (L.) amazonensis*: MHOM/BR/1973/M2269 e IFLA/BR/67/PH8 gentilmente cedidos, respectivamente, pelo Doutor Luiz Felipe Passero, do Laboratório de Patologia de Moléstias Infeciosas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (LPMI-FMUSP) e pela Doutora Liliane Rocha, do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil (LLDC-INPA).

A estirpe HOM de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) foi isolada de um paciente com LTA, no Estado do Pará, Brasil. Os parasitas foram identificados por anticorpos monoclonais e perfis de isoenzimas no Instituto Evandro Chagas, Belém, Estado do Pará, Brasil (Yamamoto *et al.*, 2013). Em todos os ensaios foram utilizados promastigotas com menos de quinze passagens em cultura.

A estirpe PH de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foi isolada de um flebotomídeo, em Belém, no Estado do Pará, Brasil. A identificação foi determinada por isoenzimas no Instituto Evandro Chagas (Machado *et al.*, 1994). Os parasitas utilizados nos ensaios tinham mais de trinta passagens em cultura.

2.1.3. *Leishmania (V.) shawi*

L. (V.) shawi (MHOM/BR/96/M15789) foi isolada de um paciente com LC, na cidade de Buriticupu, Estado do Maranhão, Brasil e mantidos em murganhos BALB/c, sendo posteriormente isolados a partir de lesões nas patas dos animais. Esta estirpe foi classificada por anticorpos monoclonais e isoenzimas no Instituto Evandro Chagas (Passero *et al.*, 2012) e gentilmente cedida pelo Doutor Luiz Felipe Passero (LPMI-FMUSP). Os promastigotas utilizados tinham menos de vinte passagens em cultura.

2.1.4. *Leishmania (V.) guyanensis*

Os parasitas *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19663) foram isolados de um paciente com LTA, em Santarém no estado do Pará, Brasil e gentilmente cedidos pelo Doutor Luiz Felipe Passero (LPMI-FMUSP). A estirpe foi identificada por isoenzimas no Instituto Evandro Chagas. Os parasitas utilizados tinham mais de vinte passagens em cultura.

2.2. Cultura de promastigotas axénicos

A cultura de promastigotas foi realizada em meio de Schneider (do inglês *Schneider's Insect Medium*, SCHN, Sigma-Aldrich) contendo L-glutamina e suplementado com 10% (v/v) de FBS inativado, 100 U.mL⁻¹ de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e a pH 7,2. Os parasitas foram incubados a 24 °C em estufa refrigerada (Lovibond, Alemanha).

2.3. Cultura de amastigotas axénicos

De forma a obter amastigotas axénicos adaptou-se o método desenvolvido por Dias Costa *et al.* (2009) e Goyard *et al.* (2003). Colocaram-se 2×10⁶ promastigotas em meio de SCHN suplementado com 0,5% (m/v) de L-glutamina, 10% (v/v) de FBS inativado, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina e 2% (v/v) de urina humana estéril, proveniente de um dador saudável do sexo masculino. O pH final foi acertado para 5,5. Os parasitas foram incubados a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera húmida durante 15 dias.

2.4. Visualização das formas promastigota e amastigota

De forma a garantir a total transformação das formas promastigotas em amastigotas axénicos pelo protocolo adaptado, além de terem sido analisadas morfológicamente por microscopia ótica, foram também visualizadas por microscopia eletrónica de varrimento.

2.4.1. Preparação das amostras

A concentração (parasitas.mL⁻¹) de promastigotas metaclíclicos e amastigotas axénicos foi calculada por microscopia ótica, utilizando um hemacitómetro (câmara de Neubauer). A concentração foi ajustada para 2×10⁶ parasitas.mL⁻¹ por centrifugação

(1800×g durante 10 min) e ressuspensa em 250 µL de uma solução de tampão fosfato 1× (do inglês *phosphate buffered saline*, PBS, Lonza) com 2% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich). Após incubação de 20 min a 4 °C foram novamente centrifugados, ressuspensas em 250 µL de PBS 1× e guardados a 4 °C.

2.4.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento

As amostras foram colocadas numa malha millipore e imersas em solução de *Karnovsky* (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.2 – 7.4 (Sigma-Aldrich) e fixadas com solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2% (Sigma-Aldrich) durante 1 h. Terminado este período, as amostras foram novamente lavadas com tampão cacodilato de sódio e desidratadas com ciclos de etanol a diferentes percentagens (30, 50, 70,80, 90 e 100%). De seguida as amostras foram secas e revestidas com partículas de ouro de paládio. As amostras foram montadas em *stubs*, observadas em microscópio eletrónico de varrimento (JEOL 5200-LV) e fotografadas. A microscopia eletrónica de varrimento foi gentilmente realizada pela Professora Doutora Graça Alexandre-Pires da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

3. Avaliação em tempo real da atividade de efluxo em macrófagos e parasitas do género *Leishmania*

3.1. Método fluorimétrico semi-automático em tempo real

Com o objetivo de clarificar o envolvimento dos transportadores de membrana no efluxo dos fármacos, habitualmente utilizados no tratamento da leishmaniose utilizou-se um método semi-automático desenvolvido por Viveiros *et al.*, (2008) que quantifica a acumulação de brometo de etídio (EtBr) em tempo real. Esta técnica é realizada num termociclador Rotor-GeneTM 3000 (Corbett Research, Austrália) que utiliza um programa que permite fazer a leitura em tempo real da fluorescência emitida. Os comprimentos de onda de excitação e emissão do EtBr são, respetivamente, 530 nm e 585 nm, e a fluorescência é lida em ciclos de 60 seg, a 37 °C. Esta técnica tem sido bastante utilizada no estudo de bombas de efluxo em bactérias mas, até à realização deste trabalho nunca tinha sido aplicado a protozoários.

Este método fluorimétrico semi-automático permite avaliar o transporte contínuo de substratos fluorescentes através da membrana celular de células eucariotas viáveis. A fluorescência pode ser correlacionada com o aumento da atividade de efluxo e o decréscimo da permeabilidade na presença constante de fármacos, uma vez que, a cinética do transporte reflete o balanço entre a acumulação intracelular de substrato por difusão passiva decorrente da permeabilidade da membrana e a extrusão ativa através das bombas de efluxo (Viveiros *et al.*, 2008).

O EtBr (substrato das bombas de efluxo) é um composto fluorescente frequentemente utilizado para monitorizar o transporte do fluorocromo através da membrana celular utilizando os sistemas de efluxo. Este composto gera um sinal quantificável que é amplificado no interior da célula e reduzido no exterior (Viveiros *et al.*, 2010).

3.1.1. Preparação das amostras

Anteriormente a cada ensaio, a concentração (parasitas.mL⁻¹) de promastigotas metacíclicas e amastigotas axénicos em cultura foi determinada por microscopia ótica utilizando um hemacitómetro. As culturas foram centrifugadas a 1800×g, durante 10 min com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9 % (m/v) estéril e a concentração ajustada para 1×10⁶ células.mL⁻¹. Processo idêntico foi realizado com macrófagos não parasitados. O número de células viáveis foi calculado por microscopia ótica utilizando um hemacitómero e por exclusão do corante azul de tripano.

3.1.2. Determinação da concentração de EtBr

De forma a determinar a concentração não tóxica de EtBr e que não provoque acumulação no interior das células durante o período do ensaio, alíquotas de 95 µL (1×10⁶ células.mL⁻¹) de macrófagos e parasitas foram transferidas para microtubos de 0,2 mL, aos quais se adicionou 5 µL de uma solução de modo a obter concentrações finais variáveis de EtBr (Sigma-Aldrich): 0,25; 0,5; 1 e 2 µg.mL⁻¹. Após cada ensaio, a viabilidade dos macrófagos e promastigotas foi avaliada por microscopia ótica. No caso dos macrófagos, esta avaliação foi realizada com o corante de exclusão azul de tripano. Enquanto nos promastigotas a viabilidade foi constatada pela observação da mobilidade. Nos amastigotas, que não apresentam flagelo livre e são praticamente imóveis, a

viabilidade foi analisada por reversão para promastigotas. Os amastigotas que restaram, após terem sido retirados os parasitas necessários para a realização dos ensaios, foram colocados em meio SCHN suplementado com 10% (v/v) de FBS a pH 7,2 e a 24 °C e a reversão para promastigotas verificada ao fim de 30 dias por microscopia ótica.

A curva de acumulação de EtBr (UFA, número de unidades arbitrárias de fluorescência/minuto) permite avaliara acumulação/efluxo basal e possíveis alterações induzidas por inibidores/moduladores de bombas de efluxo (EPI). Este método permite identificar compostos que atuam como inibidores de bombas de efluxo, uma vez que quanto mais EtBr é retido no interior das células maior a fluorescência obtida. A concentração adequada de EtBr a utilizar nos ensaios foi determinada com base na curva de acumulação obtida para cada concentração.

Na escolha da concentração de EtBr a utilizar foi tido em conta dois critérios: a toxicidade e o efluxo do composto. Foi selecionada a concentração de EtBr que não afetou a viabilidade celular no período do ensaio e a mais alta concentração que não originou acumulação do composto no interior das células e dos parasitas.

A partir dos resultados obtidos, foram determinados os seguintes critérios de acumulação de EtBr: ausência de acumulação traduzida por valores obtidos em macrófagos e parasitas não tratados, em oposição à acumulação representado por valores superiores ao valor indicativo de *cut-off* (VIC). O VIC foi determinado com base no resultado do somatório dos valores dos controlos negativos acrescido duas vezes do valor do desvio padrão.

3.1.3. Inibidores de bombas de efluxo (EPI)

Diferentes compostos conhecidos como EPI foram testados: Tioridazina (TZ), Promezina (PZ), Prometazina (PMZ), Verapamil (VER), Ortovanadato de sódio (ORT) e Phe-Arg Beta-Naphthylamide (PAβN) (Sigma-Aldrich). Todas as soluções foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração utilizando microfiltros de 0,22 μm.

3.1.4. Ensaio de acumulação de EtBr

Posteriormente à determinação da concentração mínima de EtBr para a qual foi obtido sinal, foram distribuídas alíquotas de 1×10^6 células.mL⁻¹ de macrófagos e de parasitas para tubos de 0,2 mL, às quais se adicionou 5µL das soluções stock dos vários compostos. E por último foram adicionados 5µL de solução stock de EtBr de modo a obter a concentração final de 0,5 µg.mL⁻¹. As concentrações utilizadas (para as quais se obteve sinal quantificável com a metodologia utilizada e em células eucariotas) encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações dos EPI utilizadas nos ensaios de acumulação de EtBr. Diferentes concentrações (µg.mL⁻¹) de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN foram utilizados para monitorizar a atividade de bombas de efluxo em macrófagos (P388D1) e nas espécies de *Leishmania*.

	Concentração (µg.mL ⁻¹)
Controlo	0,000
TZ	25,000
VER	25,000
	50,000
PZ	25,000
PMZ	40,000
	6,250
ORT	12,500
	25,000
PAβN	6,250
	12,500
	25,000

Os tubos foram posteriormente colocados num termociclador Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research) que faz leituras da fluorescência originada pela acumulação do EtBr no interior das células, em tempo real. A cinética do transporte da acumulação e efluxo

de EtBr na presença e ausência de EPI foi avaliada. Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* de Análise do Rotor-Gene 6.1 (Build 93) desenvolvido por Corbett Research. Cada amostra foi analisada em triplicado e foram realizadas três experiências independentes. Células e parasitas (amastigotas e promastigotas) não tratados com EPI foram usados como controle.

Após cada ensaio, a viabilidade dos macrófagos, promastigotas e amastigotas foi verificada, tal como descrito em 3.1.2.

3.1.5. Análise estatística

Os resultados expressam a média de três experiências independentes e três réplicas por amostra e o respectivo desvio padrão, em que foram apenas considerados a totalidade dos resultados positivos ou negativos, tendo em conta o VIC.

Os valores obtidos (UFa aos 60 min) foram comparados entre os grupos em estudo (células e parasitas tratados com TZ, VER, PZ, PMZ, ORT ou PABN) e o grupo controle (células e parasitas não tratados).

A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste não paramétrico para duas amostras independentes Mann-Whitney *U*, utilizando o *software* SPSS Statistics versão 16.0 (IBM, E.U.A.). Níveis de 5% ($p < 0,05$) foram considerados na avaliação da significância estatística dos resultados em análise.

4. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania dos EPI

Com o objetivo de determinar a citotoxicidade dos EPI utilizados para avaliar a atividade de efluxo, macrófagos (P388D1) e promastigotas do género *Leishmania* foram tratados com diferentes concentrações de EPI. As concentrações utilizadas encontram-se descritas na Tabela 3.

O método da resazurina foi utilizado para determinar a viabilidade dos macrófagos e dos parasitas. A resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) é um indicador redox que quando convertido em resorufina por células metabolicamente ativas origina um composto colorimétrico e fluorescente (Toté *et al.*, 2009).

II. Material e Métodos

Tabela 3: Concentrações mínimas e máximas dos EPI utilizadas na determinação da citotoxicidade e eventual atividade antileishmania. Diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PA β N foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade em macrófagos (P388D1) e nas diferentes espécies de *Leishmania* em estudo.

EPI	Concentração mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração máxima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
TZ	0,195	25,000
VER	1,563	200,000
PZ	1,563	200,000
PMZ	1,250	160,000
ORT	1,563	200,000
PA β N	1,563	200,000

Anteriormente a cada ensaio, a concentração (promastigotas. mL^{-1}) de promastigotas metaclílicas em cultura foi determinada por microscopia ótica utilizando um hemacitômetro. As culturas foram centrifugadas a $1800\times g$, durante 10 min com solução de NaCl a 0,9 % (m/v) estéril. Procedimento idêntico foi realizado com macrófagos não parasitados. O número de células foi calculado por microscopia ótica na presença de corante de exclusão azul de tripano, utilizando um hemacitômetro. Todas as amostras foram analisadas em duplicado e em três ensaios independentes.

4.1. Macrófagos

4.1.1. Otimização do ensaio de citotoxicidade

A otimização do ensaio de viabilidade da linha celular P388D1 foi realizada após adaptação do método desenvolvido por Vale-costa *et al.* (2012). Os ensaios foram realizados em microplaca preta de 96 poços (Nunc, Dinamarca) utilizando densidades celulares compreendidas entre 2×10^4 e $6,4\times 10^5$ células/poço em RPMI 1640 completo e suplementado com 10% (v/v) de FBS. Células tratadas com solução aquosa de paraformaldeído a 2% (células inviáveis) foram utilizadas como controlo negativo. Após 24, 48 e 72 h de incubação a 37°C com 5% de CO_2 em atmosfera húmida, uma solução de resazurina em PBS 1 \times com concentração final $0,033 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) foi adicionada a cada poço. A metabolização da resazurina por células viáveis foi

determinada por fluorescência imediatamente após adição da resazurina (tempo zero) e após 1, 2, 3, 4 e 5 h de incubação a 37 °C, com 5% de CO₂ em atmosfera húmida. A intensidade da fluorescência foi lida a 595 nm, após excitação a 535 nm, em fluorímetro TRIAD™ 1065 (DYNEX Technologies, E.U.A.) e analisados pelo *software* Concert™-TRIAD™ versão 2.1.0.17, desenvolvido por DYNEX Technologies. A análise dos resultados foi feita por regressão linear.

4.1.2. Avaliação da citotoxicidade dos EPI

O valor de 10 e 50% da concentração citotóxica (respetivamente, CC₁₀ e CC₅₀) dos diferentes EPI em macrófagos foi determinado pelo método da resazurina previamente otimizado. O ensaio foi realizado em microplaca preta de 96 poços com diluições decrescentes de EPI. As concentrações finais descritas na Tabela 2 foram determinadas na presença de $1,6 \times 10^5$ macrófagos. Após 72 h de incubação a 37°C, com 5% de CO₂ em atmosfera húmida, foi adicionado uma solução de resazurina em PBS 1× com concentração final $0,033 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Células tratadas com solução aquosa de paraformaldeído 2% e células não tratadas foram mantidas em placas distintas e utilizadas como controlo. A intensidade da fluorescência foi lida ao fim de 1 h em fluorímetro e os resultados analisados pelo respetivo *software*. O valor de CC₁₀ e CC₅₀ foi determinado com o *software* GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Inc., E.U.A.). As células não tratadas foram consideradas viáveis na sua totalidade (100%).

4.2. Parasitas do género *Leishmania*

4.2.1. Otimização do ensaio de citotoxicidade

O protocolo de otimização da viabilidade celular da forma promastigota foi adaptado a partir dos métodos desenvolvidos por Hendrickx *et al.* (2012), Vale-Costa *et al.* (2012), Corral *et al.* (2013) e Kulshrestha *et al.* (2013). Os ensaios foram realizados em microplaca preta de 96 poços e com densidades de promastigotas metacíclicos compreendidas entre $2,5 \times 10^5$ e $8,0 \times 10^6$ parasitas/poço em SCHN suplementado com 10% (v/v) de FBS. Parasitas tratados com uma solução aquosa de paraformaldeído a 2% (parasitas inviáveis) foram mantidos numa placa distinta e usados como controlo negativo. Após 24, 48 e 72h de incubação a 24 °C foi adicionada a cada poço uma solução de resazurina em PBS 1× com concentração final $0,067 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A metabolização da

resazurina por parasitas viáveis foi determinada por fluorescência imediatamente após adição da resazurina (tempo zero) e depois de 1, 2, 3, 4 e 5 h de incubação a 24 °C. A intensidade da fluorescência foi lida em fluorímetro a 595 nm, após excitação a 535 nm e os resultados analisados pelo respetivo *software*. A análise dos resultados foi realizada por regressão linear.

4.2.2. Avaliação da atividade antileishmania dos EPI

A concentração inibitória (IC) dos diferentes EPI em promastigotas foi determinada utilizando o método da resazurina previamente otimizado. O ensaio foi realizado em microplaca preta de 96 poços com diluições decrescentes dos EPI. As concentrações finais (Tabela 2) foram determinadas na presença de 5×10^5 parasitas. Após 24 h de incubação a 24 °C foi adicionada uma solução de resazurina em PBS 1× com concentração final $0,067 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Parasitas tratados com uma solução aquosa de paraformaldeído a 2% e não tratados foram mantidos em placas distintas e usados como controlos. A intensidade da fluorescência foi lida ao fim de 4 h e os resultados analisados pelo respetivo *software*. Os valores de 10% da concentração inibitória (IC₁₀) e 50% da concentração inibitória (IC₅₀) foram determinados com o *software* GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Inc). Parasitas não tratados foram considerados viáveis na sua totalidade (100%).

4.3. Determinação do índice de seleção dos EPI

Os fármacos clássicos e novos compostos com ação antileishmania deveriam ser compostos com toxicidade reduzida para as células e elevada atividade antileishmania, apresentando elevada seletividade para o agente patogénico em estudo.

Com o intuito de determinar a seletividade dos compostos em estudo foi calculado o índice de seleção (IS):

$$\text{Índice de Seleção} = \frac{CC_{50} \text{ macrófagos}}{IC_{50} \text{ parasitas}}$$

Em que o CC₅₀ representa 50% da concentração citotóxica de EPI em macrófagos e o IC₅₀ representa 50% da concentração inibitória de EPI em parasitas.

5. Internalização de fármacos clássicos e novos compostos com atividade antileishmania

Macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. foram utilizados para caracterizar a internalização de fármacos clássicos e novos compostos com atividade antileishmania.

Relativamente aos fármacos clássicos foram utilizados uma solução comercial de Glucantime[®] (Merial, França) com 81 mg.mL⁻¹ de antimoniato de meglumina e uma solução comercial de Milteforan[®] (Virbac, França) com 20 mg.mL⁻¹ de miltefosina.

Foram utilizados três novos compostos com atividade antileishmania previamente descrita e uma formulação de dois compostos: ácido ursólico, CH8, quercetina e solução de ácido oleanólico e ácido ursólico. O ácido ursólico e ácido oleanólico foram gentilmente cedidos pelo Doutor Luiz Felipe Passero (LPMI-FMUSP) e pelo Doutor João Lago (ICAQF-UFSP). Por sua vez, a quercetina e a CH8 foram gentilmente cedidos pela Doutora Bartira Rossi Bergmann (IBCCF-UFRJ). Os compostos foram dissolvidos em DMSO de forma que a concentração mais elevada utilizada contivesse menos de 1% de DMSO. As amostras foram analisadas em duplicado em três ensaios independentes. As concentrações utilizadas na avaliação da atividade antileishmania dos fármacos clássicos e novos compostos encontram-se descritos na Tabela 4.

5.1. Avaliação da citotoxicidade dos fármacos clássicos e dos novos compostos

A CC₁₀ e CC₅₀ dos fármacos e compostos em macrófagos foram determinados utilizando o método da resazurina previamente otimizado. O ensaio foi realizado em placa preta de 96 poços e com diluições decrescentes dos diferentes compostos em RPMI 1640 completo suplementado com 10% (v/v) de FBS. As concentrações finais descritas na Tabela 4 foram testadas na presença de 1,6×10⁵ macrófagos. Após 72 h de incubação a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera húmida foi adicionada uma solução de resazurina em PBS 1× com concentração final de 0,033 µg.mL⁻¹. Macrófagos tratados com paraformaldeído a 2%, e com concentração de DMSO idêntica à utilizada em macrófagos tratados com os compostos foram mantidos em placas distintas e usados como controlos negativos. A intensidade da fluorescência foi lida ao fim de 1 h. Os valores de IC₁₀ e IC₅₀ foram determinados com o *software* GraphPad Prism. Células não tratadas foram consideradas totalmente viáveis (100%).

II. Material e Métodos

Tabela 4: Concentrações mínimas e máximas dos fármacos e novos compostos utilizados na determinação da citotoxicidade e atividade antileishmania. As concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de antimoniato de meglumina, miltefosina, associação de ácido ursólico e oleanólico, ácido ursólico, CH8 e quercetina foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade de macrófagos (P388D1) e de parasitas.

Fármacos e novos compostos	Concentração mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração máxima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Antimoniato de meglumina	0,980	500,000
Miltefosina	0,390	50,000
Ácido oleanólico e ursólico	0,780	100,000
Ácido ursólico	0,780	100,000
Chalcona (CH8)	0,514	65,800
Quercetina	0,472	60,440

5.2. Avaliação da atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos

A concentração inibitória dos fármacos clássicos (antimoniato de meglumina e miltefosina) e dos novos compostos (associação de ácido oleanólico e ácido ursólico, ácido ursólico, chalcona e quercetina) foi determinada em parasitas do género *Leishmania*, utilizando o método da resazurina previamente otimizado. O ensaio foi realizado em placa preta de 96 poços (Nunc) com diluições decrescentes dos diferentes compostos em SCHN suplementado com 10% (v/v) de FBS. As concentrações finais descritas na Tabela 3 foram testadas na presença de 5×10^5 parasitas. Após 24 h de incubação a 24 °C, foi adicionada uma solução de resazurina em PBS 1× com concentração final $0,067 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Parasitas tratados com paraformaldeído a 2% e com DMSO em concentração idêntica à utilizada nos parasitas tratados com os compostos foram mantidas em placas distintas como controlo negativo.

A intensidade da fluorescência foi quantificada ao fim de 4 h e os valores de IC_{10} e IC_{50} determinados. Parasitas não tratados foram considerados totalmente viáveis (100%).

Com o intuito de determinar se os diferentes fármacos e compostos com atividade antileishmania afetam maioritariamente a viabilidade dos macrófagos ou parasitas, o índice de seleção foi calculado tal como descrito em 4.3.

6. Internalização de fármacos clássicos e novos compostos por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp.

6.1. Otimização da infecção da linha celular P388D1

A concentração (promastigotas.mL⁻¹) de promastigotas metacíclicos em cultura foi calculada por microscopia ótica, utilizando uma Câmara de Neubauer. A concentração e a viabilidade (células.mL⁻¹) de macrófagos P388D1 foram determinados por microscopia ótica na presença do corante azul de tripano.

Em cada poço de uma placa de 96 poços foram colocados 1×10^5 células em meio RPMI 1640 completo e com 10% (v/v) FBS. Promastigotas na proporção de 3:1 e 5:1 parasita:macrófago foram adicionados. A placa foi incubada durante 5, 18, 24 e 48 h a 37 °C, com 5% de CO₂ em atmosfera húmida. Macrófagos não infetados foram usados como controlo. Terminados os períodos de incubação, foi efetuado o *cytospin* das amostras que foram posteriormente fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A percentagem de células parasitadas e o número de amastigotas por macrófago foi determinado para cada período de tempo.

6.1.1. Infecção da linha celular P388D1

A infecção dos macrófagos foi realizada segundo o método anteriormente otimizado. A uma suspensão de 8×10^5 macrófagos.mL⁻¹ em RPMI 1640 completo suplementado com 10% (v/v) FBS foram adicionados promastigotas na proporção de 3 parasitas:1 macrófago. Promastigotas e macrófagos foram incubados a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera húmida por períodos de tempo variáveis: *L. infantum* e a estirpe HOM de *L. amazonensis* durante 5 h; *L. shawi* durante 18 h; *L. guyanensis* durante 24 h e a estirpe PH de *L. amazonensis* durante 48 h. Após o período de incubação e de forma a retirar todos os promastigotas livres (não internalizados) a suspensão de parasitas foi lavada três vezes com solução estéril de NaCl a 0,90% (m/v) a 300×g durante 10 min.

6.2. Tratamento de macrófagos infectados com fármacos clássicos e novos compostos em conjugação com EPI

Após infecção com as espécies de *Leishmania* em estudo, a concentração de macrófagos viáveis, calculada por microscopia ótica utilizando um hemacitómetro e o corante de exclusão azul de tripano, foi ajustada para 5×10^4 macrófagos.mL⁻¹ em RPMI 1640 completo e suplementado com 10% FBS. A esta suspensão foi adicionado a menor concentração de VER, ORT e PAβN compreendida entre o CC₁₀ (macrófagos) e o IC₁₀ (parasitas) anteriormente determinados (Tabela 5). Estes EPI foram selecionados com base na capacidade de inibir bombas de efluxo em promastigotas e nos níveis de citotoxicidade.

Tabela 5: Concentrações de EPI utilizados no tratamento de amastigotas intracelulares. Os menores valores de CC₁₀ ou IC₁₀ (μg.mL⁻¹) de VER, ORT e PAβN determinados pelo método da resazurina foram utilizados no tratamento de macrófagos.

Parasitas	Concentração (μg.mL ⁻¹)		
	VER	ORT	PAβN
<i>L. infantum</i>	1,966	2,293	0,553
<i>L. amazonensis</i> (HOM)	1,966	1,338	11,478
<i>L. amazonensis</i> (PH)	1,966	0,829	25,000
<i>L. shawi</i>	1,966	4,130	10,223
<i>L. guyanensis</i>	1,966	1,750	5,887

Foi ainda adicionado miltefosina (MILT), ácido úrsólico (ÁC. URS), CH8 e quercetina (QUERC) na concentração de CC₁₀ previamente determinada em macrófagos (Tabela 6). No tratamento de macrófagos infectados, com base nos IC₅₀ obtidos em promastigotas, foi decidido não utilizar:

- O antimoniato de meglumina, por não ser possível determinar o seu IC₅₀ em promastigotas;

- A combinação ácido ursólico e oleanólico, por não existirem diferenças significativas quando comparados com parasitas tratados apenas com ácido ursólico.

As células foram incubadas durante 72 h, a 37 °C com 5% CO₂ em atmosfera húmida. Macrófagos infetados não tratados, tratados com os EPI ou tratados com os fármacos ou compostos foram usados como controlos. As amostras foram analisadas em quadruplicado em dois ensaios independentes.

Tabela 6: Concentrações de fármacos e compostos utilizados no tratamento de macrófagos infetados. Os valores de CC₁₀ (µg.mL⁻¹) determinados pelo método da resazurina foram utilizados na caracterização da internalização de miltefosina, ácido ursólico, CH8 e quercetina por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp.

Fármaco e compostos	Concentração (µg.mL ⁻¹)
Miltefosina	2,830
Ácido ursólico	0,091
Chalcona (CH8)	65,800
Quercetina	1,520

6.3. Determinação da taxa de infeção após tratamento com EPI e fármacos

A percentagem de células infetadas após tratamento com EPI e fármacos foi estimada pelo método de diluição limite (do inglês *limit dilution assay*, LDA).

Terminado o período de tratamento a suspensão celular foi centrifugada a 1800×g, durante 10 min, o sobrenadante rejeitado e as células ressuspendidas em SCHN suplementado com 10% (v/v) de FBS. Foi efetuada contagem por microscopia ótica e a concentração ajustada para 5×10⁴ macrófagos.mL⁻¹. Desta suspensão celular, 200µL foram colocados no primeiro poço e diluições seriadas de 1:4 foram distribuídas ao longo da placa de 96 poços. Após 15 dias de incubação a 24 °C, cada poço foi observado por microscopia ótica. Foram considerados positivos os poços em que foi observado pelo menos um promastigota e negativos os poços em não foi observado qualquer parasita. A maior diluição positiva foi utilizada para estimar a percentagem de células infetadas com parasitas viáveis através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células infetadas} = \frac{\text{reciproco da maior diluição positiva}}{n^{\circ} \text{ de células do primeiro poço}}$$

Este método permite estimar a percentagem de células infetadas com parasitas viáveis após o tratamento, tendo em conta o número de células iniciais e considerando que existe pelo menos uma célula infetada nos poços positivos. Esta percentagem é estimada através do recíproco da maior diluição em que se verifica a presença de promastigotas.

Adicionalmente, foi considerado a maior diluição positiva em que foram encontrados promastigotas viáveis. Para efeitos comparativos, adotou-se o critério de que uma diferença de 16 vezes quando comparado com outro grupo seria indicativo de que a atividade antileishmania entre os grupos difere.

6.3.1. Natureza das interações entre os compostos e os EPI

De forma a avaliar a natureza das interações entre cada composto e os EPI, foi adaptado e utilizado o método desenvolvido por Odds (2003), Chou (2010), Reimão & Tempone (2011), Mesquita *et al.* (2013), e Yin *et al.* (2014). O índice mínimo de infeção (IMI) para cada composto ou EPI foi determinada segundo a equação:

$$IMI = \frac{\% \text{ de infeção com o composto A em combinação}}{\% \text{ de infeção apenas com o composto A}}$$

A mesma equação foi aplicada ao composto B. E o somatório dos índices de ambos os compostos ($\Sigma IMI_{[A,B]}$) foi também calculado e utilizado para classificar a natureza das interações estabelecidas. Foi considerado: sinergia (isto é, existe cooperação) entre o composto e o EPI quando o somatório dos índices é inferior a 1; indiferença (têm atividades que não se relacionam) quando o somatório dos índices é superior a 1 e inferior a 4; e antagonismo (têm atividades opostas) quando o somatório dos índices é superior a 4.

6.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos (percentagem de células infetadas com parasitas viáveis) foram comparados estatisticamente do seguinte modo:

- macrófagos infectados não tratados vs os grupos em estudo (macrófagos infectados tratados com EPI, macrófagos infectados tratados com fármacos clássicos ou novos compostos e macrófagos infectados tratados com EPI e fármacos clássicos ou novos compostos);
- macrófagos tratados com fármacos clássicos ou novos compostos vs macrófagos tratados com EPI e fármacos clássicos ou novos compostos.

A análise estatística foi realizada recorrendo ao teste não paramétrico para duas amostras independentes Mann-Whitney U (SPSS) para todas as estirpes de *Leishmania* anteriormente referidas, com exceção da estirpe PH de *L. amazonensis*. Níveis de 5% ($p < 0,05$) foram utilizados para determinar a significância estatística dos resultados em análise.

III. Resultados

1. Formas promastigota e amastigota de *Leishmania* spp.

De forma a garantir a total transformação das formas promastigotas em amastigotas axénicas, ambas as formas morfológicas das espécies de *Leishmania* utilizadas no presente estudo foram visualizadas por Microscopia Eletrónica de Varrimento. Como exemplo, são apresentadas as imagens de promastigotas e amastigotas axénicas de *L. infantum* (LVZ) (Fig. 5a e b, respetivamente) e de *L. amazonensis* (LTA) (Fig. 5c e d, respetivamente).

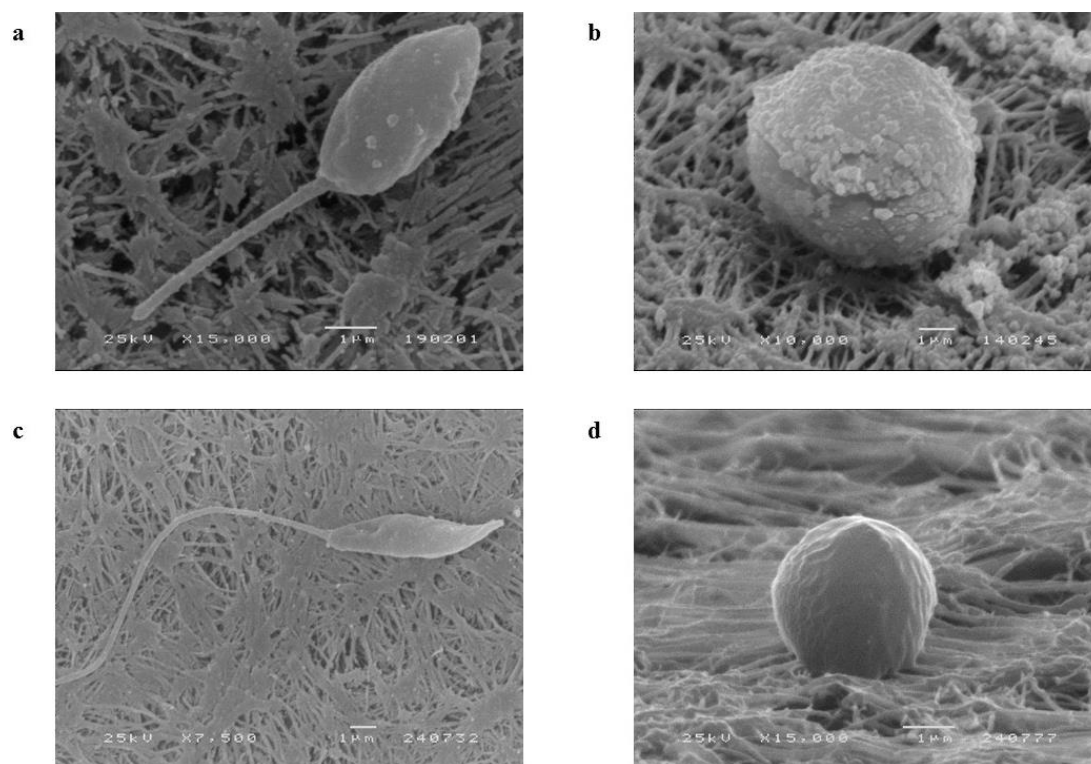


Figura 5: Formas promastigota e amastigota de *L. infantum* e de *L. amazonensis* (PH). Promastigotas (a, c) e amastigotas (b, d) de *L.(L.) infantum* (MCAN/PT/2012/IMT0005SG) (a, b) e de *L.(L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) (c, d) mantidos em cultura axénica foram visualizados por Microscopia Eletrónica de Varrimento (ampliação de 15000, 10000, 7500 e 15000×).

2. Avaliação em tempo real da atividade de efluxo em macrófagos e parasitas do género *Leishmania*

2.1. Determinação da concentração de EtBr

Com base nas curvas de acumulação de diferentes concentrações de EtBr determinou-se que a concentração de EtBr a utilizar nos ensaios seguintes seria de 0,5 µg.

mL⁻¹, quer para macrófagos quer para parasitas (promastigotas e amastigotas axénicos). Esta concentração de EtBr não afeta a viabilidade celular (macrófagos e promastigotas axénicos) no período do ensaio (60 min) e é a mais baixa concentração que origina acumulação do composto no interior das células e dos parasitas. Dado que os amastigotas se encontravam em solução de brometo não seria viável transferi-los para cultura, não tendo portanto sido confirmado a reversão para promastigotas, pelo que foi assumido que mantinham a viabilidade à semelhança dos promastigotas. Na Fig. 6 encontram-se representadas, a título exemplificativo, curvas de acumulação EtBr em que cada ponto representa os valores médios de fluorescência (unidades arbitrárias) obtidos em cada ciclo de 60 seg e durante 60 min.

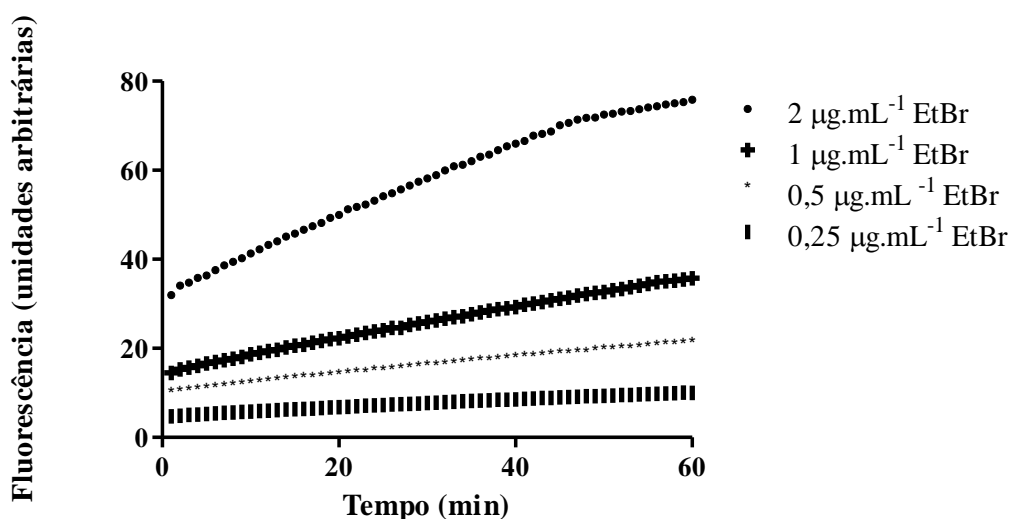


Figura 6: Curvas de acumulação de EtBr no interior de macrófagos. A concentração de EtBr utilizada em ensaios de monitorização da atividade de efluxo em macrófagos (P388D1) foi determinada num aparelho Rotor-Gene 3000 utilizando concentrações crescentes (0,25, 0,5, 1 e 2 µg.mL⁻¹). O método utilizado quantifica a acumulação de EtBr em tempo real no interior dos macrófagos, gerando curvas de acumulação do composto para as diferentes concentrações. Cada ponto representa os valores médios de fluorescência (unidades arbitrárias) obtido em cada ciclo de 60 seg e durante 60 min.

2.2. Ensaio de acumulação de EtBr em macrófagos

Nos ensaios de acumulação de EtBr verificou-se que macrófagos não tratados apresentaram um VIC (valor indicativo de *cut-off*¹) de 2,69. A média dos valores (UFa,

¹ Determinado com base no resultado da média do somatório dos controlos negativos acrescido de duas vezes o valor do desvio padrão.

III. Resultados

unidades arbitrárias de fluorescência) obtidos em macrófagos tratados com diferentes EPI e respectivas concentrações encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com inibidores de bombas de efluxo (EPI). A acumulação de EtBr (unidades arbitrárias de fluorescência -Ufa) foi medida aos 60 min em macrófagos (P388D1) não tratados (controle) e tratados com concentrações variáveis ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de EPI. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição.

	Concentração de EPI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Média (Ufa) \pm DP
Controlo	0,00	2,03 \pm 0,33
TZ	25,00	4,39 \pm 0,50
VER	25,00	2,12 \pm 0,11
	50,00	2,35 \pm 0,46
PZ	25,00	2,29 \pm 0,26
PMZ	40,00	2,92 \pm 0,43
	6,25	2,11 \pm 0,08
ORT	12,50	2,39 \pm 0,38
	25,00	2,45 \pm 0,31
PAβN	6,25	1,82 \pm 0,04
	12,50	1,94 \pm 0,33
	25,00	1,70 \pm 0,22

Macrófagos tratados com TZ e PMZ (25 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respetivamente) apresentaram valores superiores ao VIC. Enquanto células tratadas com VER, PZ, ORT e PA β N revelaram valores inferiores ao VIC. Células tratadas com TZ e PMZ apresentaram aumento significativo ($p=0,002$ e $p=0,009$, respetivamente) de acumulação de EtBr quando comparadas com células não tratadas (Fig.7).

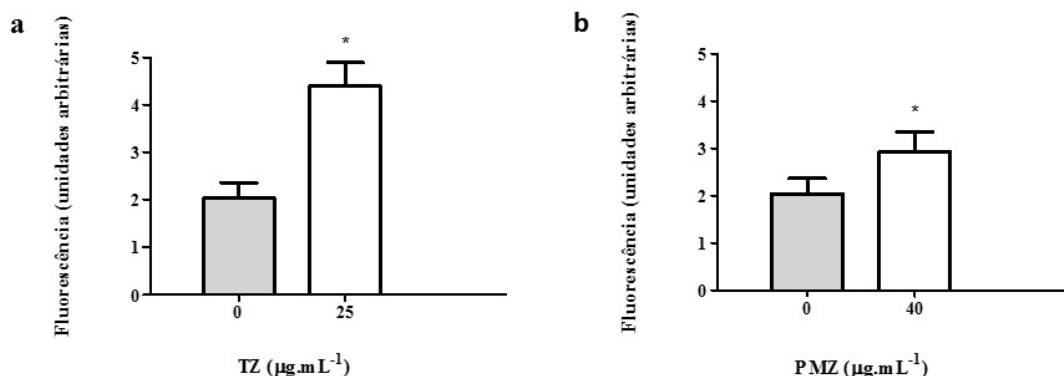


Figura 7: Acumulação de EtBr em macrófagos. A acumulação de EtBr em macrófagos tratados com 25 µg.mL⁻¹ de TZ (a) ou 40 µg.mL⁻¹ de PMZ (b) e não tratados (0) foi quantificada aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição.* ($p < 0,05$) indica diferenças significativas quando se compararam células tratadas com células não tratadas.

2.3. Acumulação de EtBr em parasitas do género *Leishmania*

2.3.1. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ)

Promastigotas avirulentos e virulentos de *L. infantum* apresentaram um VIC de 5,93, e 5,13, respetivamente. Por sua vez, amastigotas² de *L. infantum* diferenciados a partir de promastigotas avirulentos e virulentos apresentaram um VIC de 3,22 e 3,45, respetivamente. A média dos valores (UFa) de acumulação de EtBr obtidos em promastigotas e amastigotas tratados com diferentes EPI e respetivas concentrações encontram-se descritos na Tabela 8.

Os valores médios de fluorescência (UFa) obtidos em promastigotas avirulentos de *L. infantum* tratados com TZ (25 µg.mL⁻¹), VER (25 e 50 µg.mL⁻¹), PMZ (40 µg.mL⁻¹), ORT (6,25 e 12,5 µg.mL⁻¹) ou PAβN (6,25; 12,5 e 25 µg.mL⁻¹) revelaram-se superiores ao VIC. Contrariamente, os valores obtidos para PZ são inferiores ao VIC.

Os parasitas tratados com 25 µg.mL⁻¹ de TZ ($p < 0,001$, Fig. 8a), 25 e 50 µg.mL⁻¹ de VER ($p = 0,021$ e $p < 0,000$, respetivamente, Fig. 8b), 40 µg.mL⁻¹ de PMZ ($p = 0,021$, Fig. 8c), 6,25 e 12,5 µg.mL⁻¹ ($p = 0,002$ e $p = 0,011$, respetivamente) de ORT (Fig. 8d) e 6,25, 12,5 e 25 µg.mL⁻¹ de PAβN ($p = 0,006$, $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respetivamente, Fig. 8e)

² Para simplificar, os amastigotas diferenciados a partir de promastigotas avirulentos e virulentos passarão a ser denominados respetivamente, amastigotas avirulentos e amastigotas virulentos.

III. Resultados

apresentaram aumentos significativos de acumulação intracelular de EtBr quando comparados com parasitas não tratados. Os valores de acumulação de EtBr obtidos em amastigotas avirulentos de *L. infantum* nunca foram superiores ao VIC em nenhuma das condições em estudo.

Tabela 8: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axénicos de *L. infantum* tratados com EPI. A acumulação de EtBr (UFa) foi medida aos 60 min em promastigotas (Prom) e amastigotas (Amast) virulentos e avirulentos não tratados (controlo) e tratados com concentrações variáveis ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de EPI. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição.

	Concentração de EPI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média (UFa) \pm DP			
		<i>L. infantum</i> avirulentos		<i>L. infantum</i> virulentos	
		Prom.	Amast.	Prom.	Amast.
Controlo	0,00	4,59 \pm 0,68	2,30 \pm 0,46	3,41 \pm 0,86	2,43 \pm 0,51
TZ	25,00	8,15 \pm 1,87	2,59 \pm 0,35	7,68 \pm 2,48	2,37 \pm 0,22
VER	25,00	6,32 \pm 0,77	2,56 \pm 0,21	3,19 \pm 0,80	2,61 \pm 0,15
	50,00	5,94 \pm 0,96	2,49 \pm 0,25	2,90 \pm 0,62	2,33 \pm 0,14
PZ	25,00	5,54 \pm 1,22	2,64 \pm 0,33	3,19 \pm 0,76	2,46 \pm 0,19
PMZ	40,00	5,99 \pm 1,54	2,45 \pm 0,55	3,09 \pm 0,83	2,46 \pm 0,20
ORT	6,25	6,35 \pm 1,01	2,40 \pm 0,16	3,80 \pm 0,78	2,60 \pm 0,31
	12,50	6,20 \pm 1,12	2,34 \pm 0,46	3,56 \pm 0,74	2,44 \pm 0,32
	25,00	5,92 \pm 1,25	2,70 \pm 0,28	3,76 \pm 0,88	2,57 \pm 0,25
PAβN	6,25	6,76 \pm 1,56	2,32 \pm 0,32	4,44 \pm 0,45	2,28 \pm 0,25
	12,50	8,78 \pm 1,41	2,37 \pm 0,40	4,70 \pm 0,58	2,39 \pm 0,25
	25,00	8,97 \pm 2,37	2,55 \pm 0,48	5,48 \pm 0,85	2,40 \pm 0,33

Unicamente os promastigotas virulentos de *L. infantum* tratados com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TZ ou de PA β N apresentaram valores superiores ao VIC. Os valores obtidos para os restantes EPI e respetivas concentrações foram inferiores ao VIC.

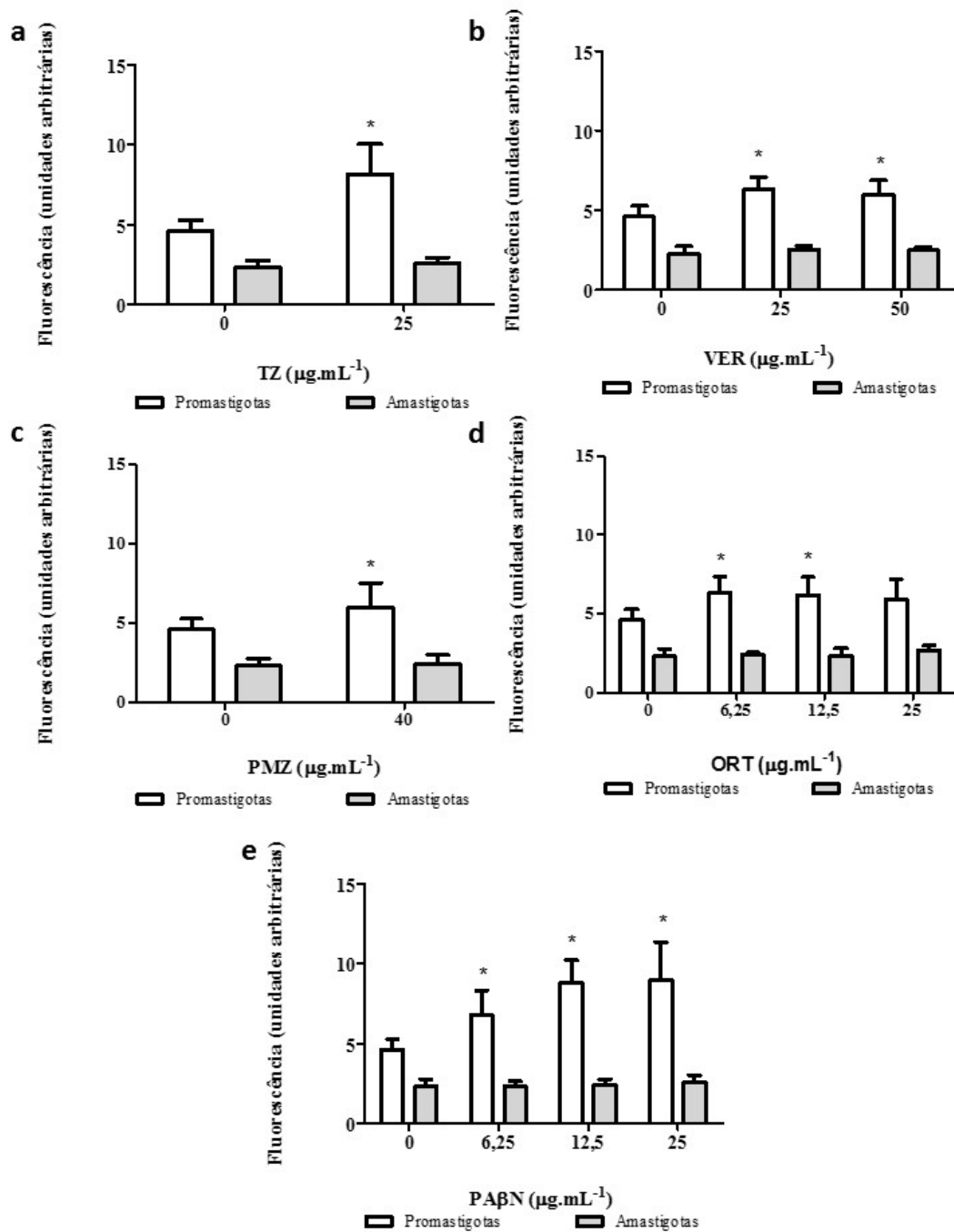


Figura 8: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas avirulentos de *L. infantum* tratados com EPI. A acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas avirulentos tratados com $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de TZ (a), 25 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de VER (b), $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PMZ (c) e com $6,25$, $12,5$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ORT (d) e de PAβN (e) e não tratados (0) foi quantificada aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas quando se comparam parasitas tratados com parasitas não tratados.

III. Resultados

A acumulação intracelular de EtBr em parasitas tratados com TZ (Fig. 9a) e PAβN (Fig. 9b) foram significativamente mais elevados ($p<0,001$ e $p=0,003$, respectivamente) do que os determinados para parasitas não tratados. Na presença de EPI, amastigotas virulentos de *L. infantum* revelaram valores de acumulação inferiores ao VIC.

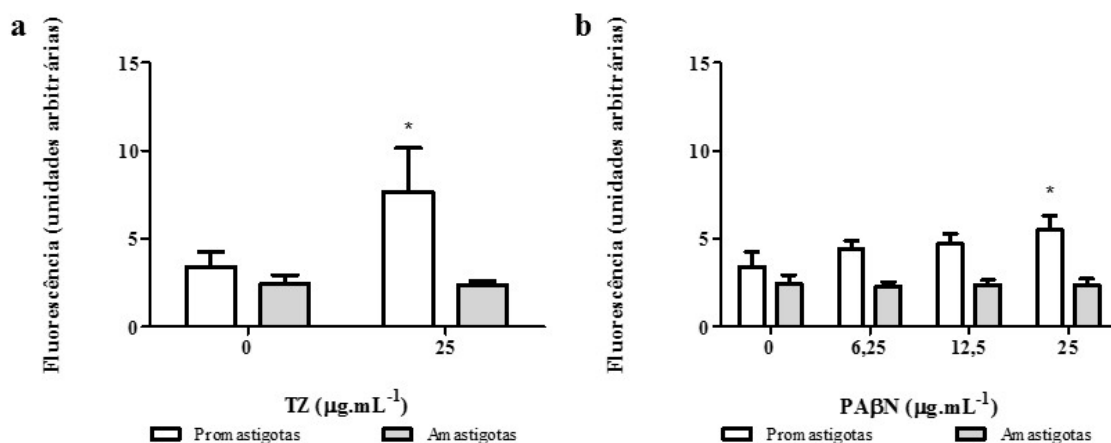


Figura 9: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas virulentos de *L. infantum* tratados com EPI. A acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas virulentos tratados com $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de TZ (a), com $6,25$, $12,5$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de PAβN (b) e não tratados (0) foi quantificada aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição. * ($p<0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

2.3.2. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Promastigotas não tratados das estirpes HOM e PH de *L. amazonensis* apresentaram um VIC de 5,09 e 5,01 respectivamente, nos ensaios de acumulação de EtBr.

Amastigotas das estirpes HOM e PH apresentaram um VIC de 2,69 e 2,14, respectivamente. A média dos valores (UFa) de acumulação intracelular de EtBr quantificados em promastigotas e amastigotas tratados com diferentes EPI e respetivas concentrações encontram-se descritos na Tabela 9.

Os valores de UFa obtidos em promastigotas da estirpe HOM tratada com PAβN ($2,5$, $12,5$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram superiores ao VIC. Os valores obtidos para os restantes EPI e respetivas concentrações foram inferiores ao VIC. As concentrações de EtBr quantificadas em parasitas da estirpe HOM tratadas com $6,25$ ($p=0,001$), $12,5$ ($p<0,001$) e 25 ($p<0,001$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PAβN revelaram-se significativamente mais elevados quando comparados com parasitas não tratados. Em contrapartida, amastigotas da estirpe HOM

tratadas com EPI apresentaram, em todas as condições de estudo valores inferiores ao VIC (Fig. 10).

Tabela 9: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axénicos das estirpes HOM e PH de *L. amazonensis* tratados com EPI. A acumulação de EtBr (UFa) foi medida aos 60 min em promastigotas (Prom) e amastigotas (Amast) não tratados (Controlo) tratados com concentrações variáveis ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de EPI. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição.

	Concentração EPI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média (UFa) \pm DP			
		<i>L. amazonensis</i> (HOM)		<i>L. amazonensis</i> (PH)	
		Prom.	Amast.	Prom.	Amast.
Controlo	0,00	3,57 \pm 0,76	1,87 \pm 0,41	3,81 \pm 0,60	1,74 \pm 0,20
TZ	25,00	3,97 \pm 0,59	1,54 \pm 0,29	5,22 \pm 1,90	1,55 \pm 0,13
VER	25,00	3,83 \pm 0,35	1,79 \pm 0,22	5,98 \pm 1,54	1,67 \pm 0,34
	50,00	3,68 \pm 0,71	1,81 \pm 0,13	7,86 \pm 2,04	1,69 \pm 0,20
PZ	25,00	4,20 \pm 0,11	2,00 \pm 0,11	8,90 \pm 1,39	1,65 \pm 0,20
PMZ	40,00	4,18 \pm 0,84	1,90 \pm 0,32	9,31 \pm 2,35	1,62 \pm 0,30
	6,25	3,73 \pm 0,74	1,85 \pm 0,18	3,81 \pm 0,60	1,53 \pm 0,23
	12,50	3,42 \pm 1,05	1,80 \pm 0,21	3,56 \pm 0,43	1,51 \pm 0,28
ORT	25,00	3,32 \pm 1,08	1,90 \pm 0,28	4,42 \pm 2,10	1,66 \pm 0,26
	6,25	5,20 \pm 0,93	1,66 \pm 0,24	6,38 \pm 2,10	1,67 \pm 0,18
PABN	12,50	6,10 \pm 0,70	1,49 \pm 0,25	11,03 \pm 3,78	1,60 \pm 0,18
	25,00	6,16 \pm 0,69	1,57 \pm 0,32	14,92 \pm 4,10	1,61 \pm 0,27

III. Resultados

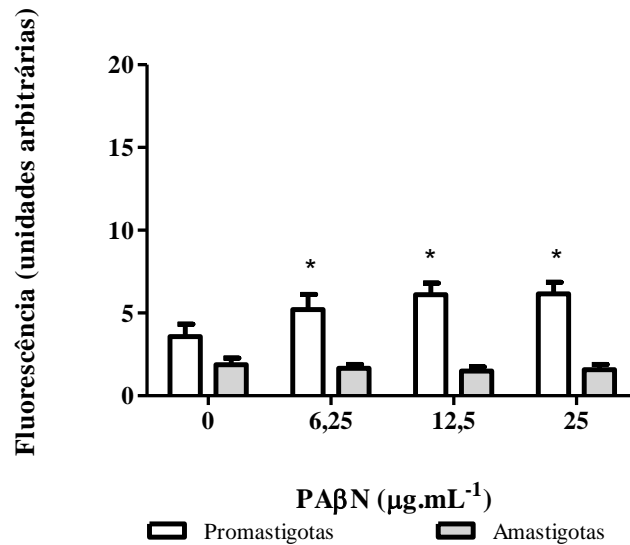


Figura 10: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas da estirpe HOM de *L. amazonensis* tratados com EPI. A acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas tratados com diluições crescentes de PAβN (6,25, 12,5 e 25 μg.mL⁻¹) e não tratados (0) foi medida aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

Os promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis* tratados com TZ (25 μg.mL⁻¹), VER (25 e 50 μg.mL⁻¹), PZ (25 μg.mL⁻¹), PMZ (40 μg.mL⁻¹) e PAβN (6,25; 12, 5 e 25 μg.mL⁻¹) apresentaram valores superiores ao VIC. Pelo contrário, os valores obtidos para ORT (6,25; 12, 5 e 25 μg.mL⁻¹) são inferiores ao VIC.

Os valores obtidos em parasitas tratados com 25 e 50 μg.mL⁻¹ de VER ($p=0,008$ e $p < 0,001$, respetivamente, Fig. 11a), 25 μg.mL⁻¹ de PZ ($p < 0,001$, Fig. 11b), 40 μg.mL⁻¹ de PMZ ($p < 0,001$, Fig. 11c), 6,25; 12, 5 e 25 μg.mL⁻¹ de PAβN ($p < 0,001$, Fig. 11d) são significativamente maiores quando comparados com parasitas não tratados. No entanto, valores obtidos em parasitas tratados com TZ foram idênticos aos obtidos em parasitas não tratados. Por sua vez, os resultados obtidos em amastigotas da estirpe PH nunca ultrapassou o VIC.

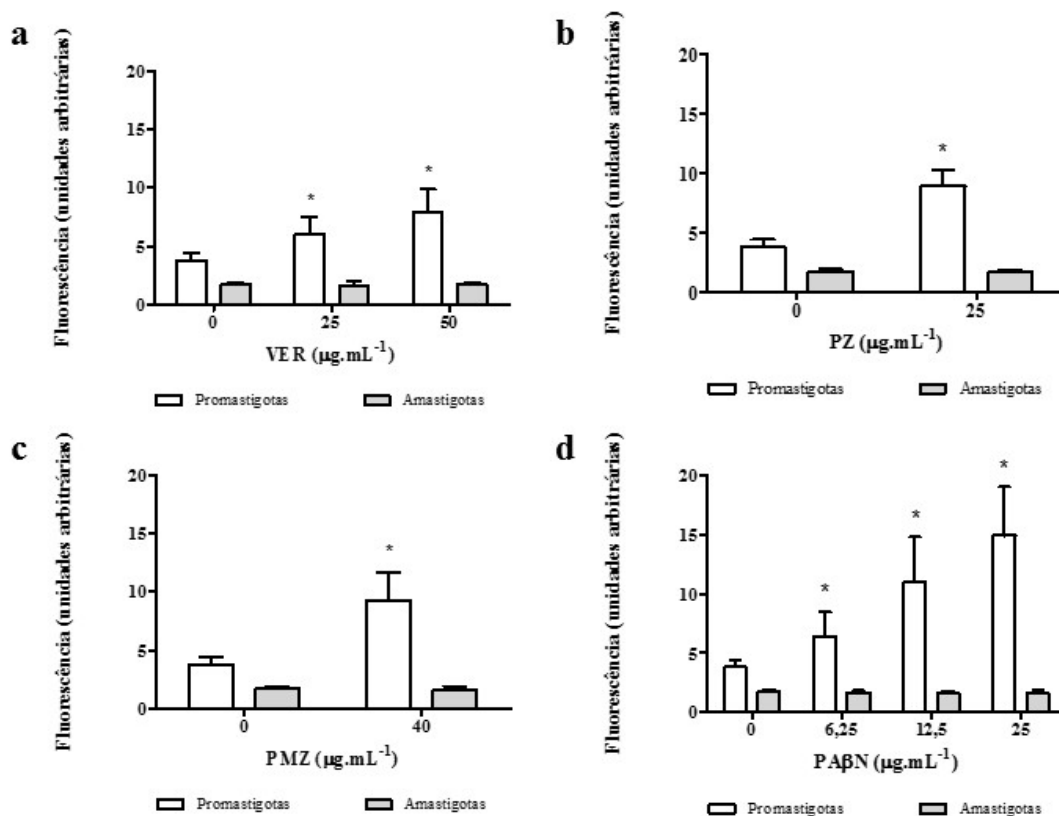


Figura 11: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis* tratados com EPI. A acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas tratados com 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de VER (a), 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PZ (b), 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PMZ (c) e com diluições crescentes (6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) PA β N (d) e não tratados (0) foram medidos aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

2.3.3. Subgênero *Viannia* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A média dos valores (Ufa) obtidos em promastigotas e amastigotas de *L. shawi* e *L. guyanensis* tratados com EPI encontram-se descritos na Tabela 10.

Promastigotas não tratados de *L. shawi* e *L. guyanensis* apresentaram um VIC de 4,94 e 5,78, respectivamente. Amastigotas não tratados de *L. shawi* e *L. guyanensis* apresentaram um VIC de 2,68 e 2,42, respectivamente. Unicamente os parasitas tratadas com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TZ e de PA β N apresentaram valores superiores ao VIC. Os valores obtidos para os restantes EPI foram em todos os casos inferiores ao VIC.

III. Resultados

Tabela 10: Acumulação de EtBr em promastigotas e amastigotas axênicos de *L. shawi* e *L. guyanensis* tratados com EPI. A acumulação de EtBr (UFa) foi medida aos 60 min em promastigota (Prom) e amastigotas (Amast) não tratados (Controlo) e tratados com concentrações variáveis ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de EPI. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão (DP) de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição.

	Concentração EPI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média (UFa) \pm DP			
		<i>L. shawi</i>		<i>L. guyanensis</i>	
		Prom.	Amast.	Prom.	Amast.
Controlo	0,00	3,16 \pm 0,89	2,26 \pm 0,21	4,68 \pm 0,55	2,12 \pm 0,15
TZ	25,00	10,13 \pm 1,13	2,02 \pm 0,30	7,88 \pm 1,48	1,96 \pm 0,29
VER	25,00	4,05 \pm 0,99	2,02 \pm 0,15	5,01 \pm 0,33	2,07 \pm 0,11
	50,00	4,37 \pm 1,18	2,05 \pm 0,30	4,09 \pm 0,47	1,88 \pm 0,17
PZ	25,00	4,33 \pm 1,11	2,16 \pm 0,32	4,74 \pm 0,29	2,12 \pm 0,30
PMZ	40,00	4,37 \pm 1,10	2,00 \pm 0,29	4,52 \pm 0,52	1,98 \pm 0,12
	6,25	4,31 \pm 1,08	2,04 \pm 0,27	4,97 \pm 0,63	1,98 \pm 0,09
ORT	12,50	4,32 \pm 1,01	2,23 \pm 0,31	5,00 \pm 0,70	2,10 \pm 0,13
	25,00	4,62 \pm 1,13	2,36 \pm 0,29	5,48 \pm 0,58	2,15 \pm 0,09
PAβN	6,25	4,48 \pm 0,75	2,10 \pm 0,45	5,42 \pm 0,55	1,90 \pm 0,15
	12,50	4,79 \pm 1,29	1,90 \pm 0,57	5,98 \pm 0,69	1,93 \pm 0,13
	25,00	5,47 \pm 1,92	2,02 \pm 0,30	6,40 \pm 0,89	2,10 \pm 0,29

Em parasitas tratados com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TZ ($p < 0,001$, Fig. 12a) e de PA β N ($p = 0,032$, Fig. 12b) os valores obtidos são significativamente mais elevados do que em parasitas não tratados. Em nenhuma das condições analisadas, o valor encontrado em amastigotas de *L. shawi* ultrapassou o VIC (Fig. 12).

Apenas promastigotas de *L. guyanensis* tratados com TZ (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e PA β N (12,5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram valores superiores ao VIC. Os valores obtidos com

VER (25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), PZ (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), PMZ (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ORT (12, 5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) são inferiores ao VIC.

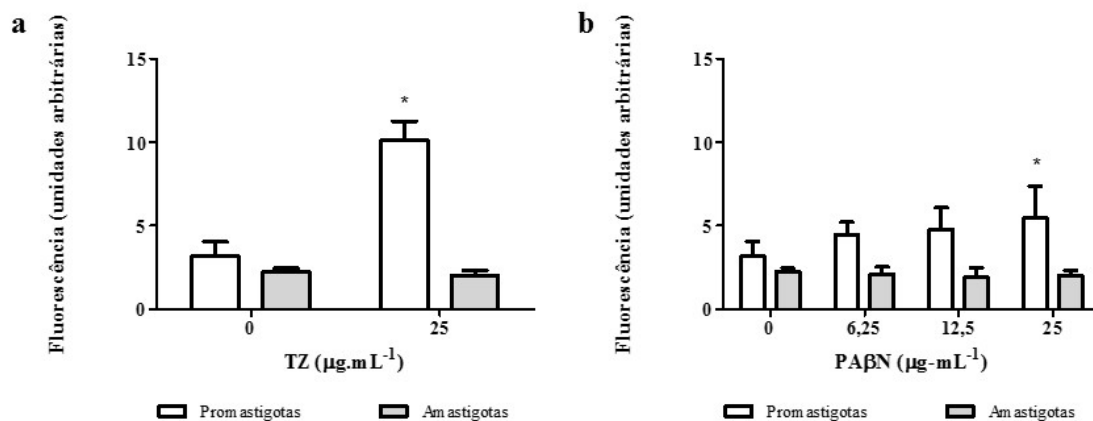


Figura 12: Acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas de *L. shawi* tratados com EPI. A acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas tratados com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TZ (a) e com 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PA β N. (b) e não tratados (0) foram medidos aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

Em parasitas tratados com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TZ ($p < 0,001$, Fig. 13a) e 12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PA β N ($p = 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente, Fig. 13b), os valores obtidos são significativamente superiores aos apresentados por parasitas não tratados. Em nenhuma das condições em estudo, o nível de fluorescência dos amastigotas ultrapassou o VIC (Fig. 13).

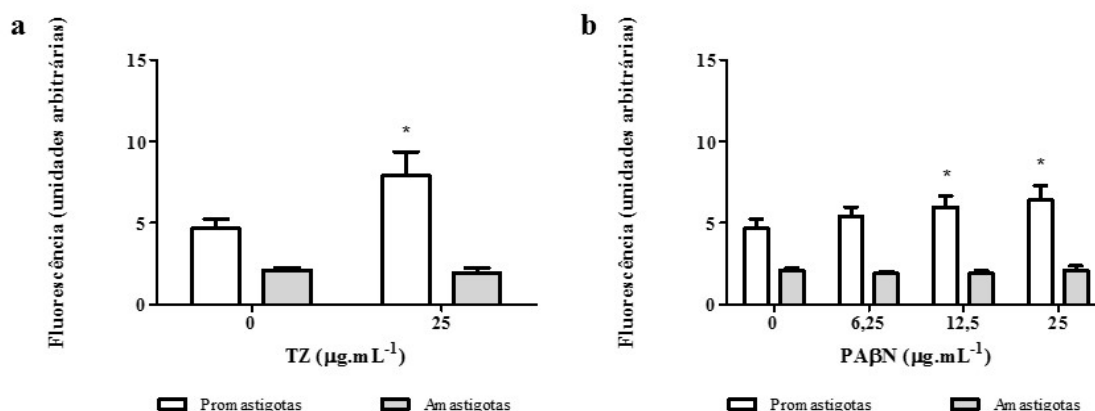


Figura 13: Acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas de *L. guyanensis* tratados com EPI. A acumulação intracelular de EtBr em promastigotas e amastigotas tratados com 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TZ (a) e com diluições seriadas (6,25; 12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de PA β N (b) e não tratados (0) foram medidos aos 60 min. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

3. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania dos EPI

3.1. Otimização do ensaio de viabilidade em macrófagos

Com o objetivo de determinar a citotoxicidade em macrófagos (P388D1) o método da resazurina foi otimizado. A viabilidade celular foi analisada em diferentes concentrações celulares em diversos períodos de incubação. Ao fim de 24 h de incubação e após a adição da resazurina, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo (h). No entanto, concentrações celulares iniciais compreendidas entre $1,6 \times 10^5$ e $6,4 \times 10^5$ células/poço, após 2, 3 e 4 h de incubação com a resazurina emitem níveis de fluorescência superior ao limite de detecção do fluorímetro, não tendo sido quantificáveis (Fig. 14a). A análise dos níveis de fluorescência em função do tempo por regressão linear apresentou valores de r^2 a variar entre 0,90 e 0,99. Sendo que de 2×10^4 a $1,6 \times 10^5$ células/poço r^2 foi superior a 0,99.

A fluorescência aumentou proporcionalmente à concentração celular nos vários períodos de tempo analisados, com exceção dos dois primeiros tempos (0 e 1 h). No entanto, apenas nos três primeiros tempos estudados (0, 1 e 2 h) a fluorescência emitida foi quantificada em todas as concentrações celulares. Em concentrações celulares mais elevadas, a fluorescência não foi detetável ao fim de 3, 4 e 5 h de incubação (Fig. 14b). A análise dos níveis de fluorescência em função das concentrações celulares por regressão linear apresentou valores de r^2 a variar entre 0,86 e 0,99. Valores de r^2 superiores a 0,99 apenas se verificam ao fim 5 h de incubação com a resazurina.

Após 48 h de incubação das células seguida da adição da resazurina, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo (h). No entanto, a fluorescência emitida não foi passível de ser quantificada nas concentrações celulares mais elevadas ($6,4 \times 10^5$, $3,2 \times 10^5$ e $1,6 \times 10^5$ células/poço) após 0, 3 e 4 h, respetivamente (Fig. 15a). A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,98 e 0,99. Sendo que apenas em 8×10^4 células/poço este valor foi inferior a 0,99. Em todas as condições anteriormente descritas foi verificado existir proporcionalidade entre a fluorescência e a densidade celular ao longo dos períodos em estudo.

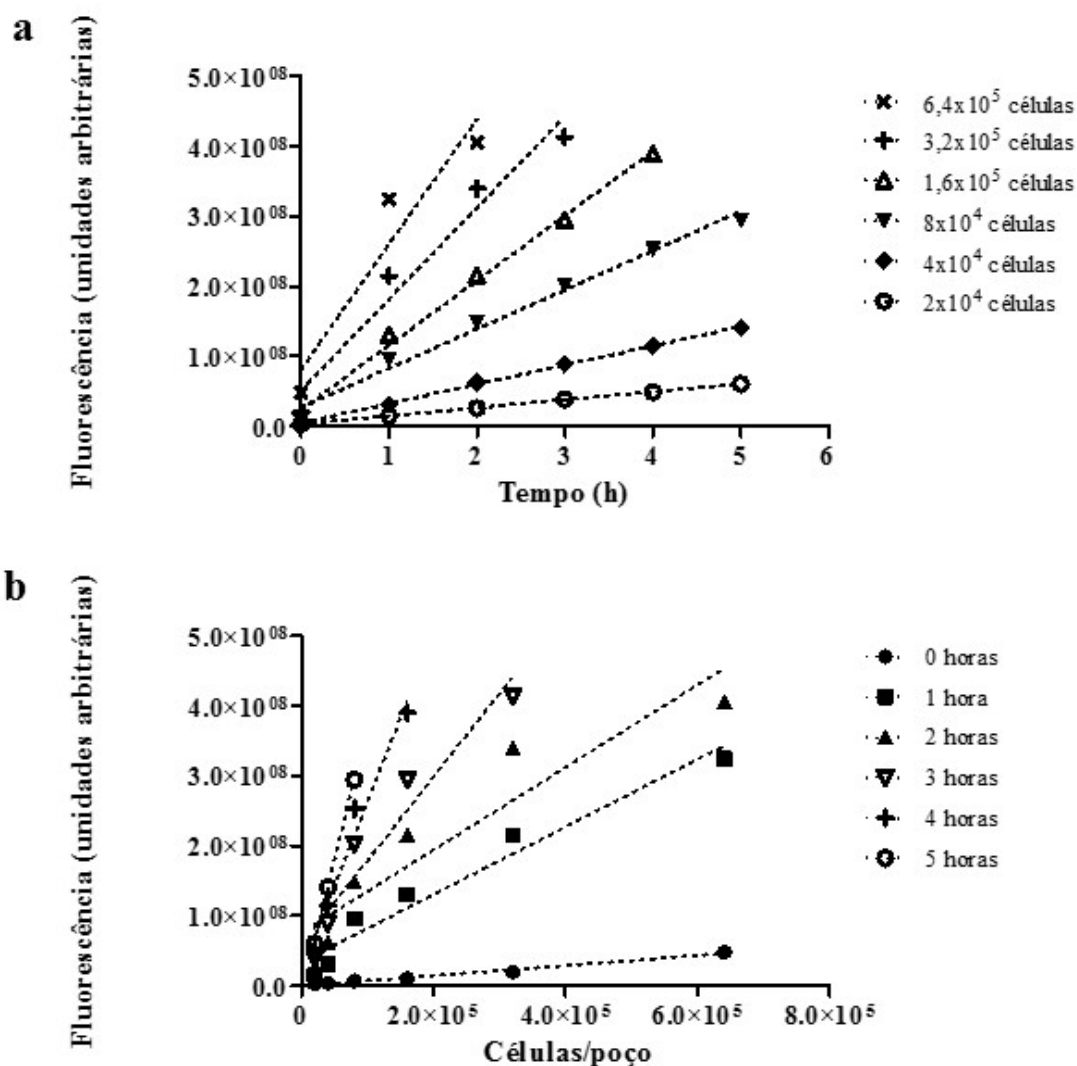


Figura 14: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 24h. Para determinar a viabilidade celular de diferentes concentrações de macrófagos (2×10^4 a $6,4 \times 10^5$ células/poço) foi utilizado a resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina que emite fluorescência. Após 24h de incubação, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

No entanto apenas às 0 h, a fluorescência emitida por todas as densidades celulares analisadas foi determinada. De facto, ao fim de 0 e 2 h de incubação para concentrações celulares de $6,4 \times 10^5$ e $3,2 \times 10^5$ e de 3 h para $1,6 \times 10^5$ células/poço a fluorescência não foi quantificada pelo método utilizado (Fig. 15b). A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função das concentrações celulares apresentou valores de r^2 a variar entre 0,94 e 0,99. Valores de r^2 superiores a 0,99 apenas foram verificados após 1h de incubação com a resazurina.

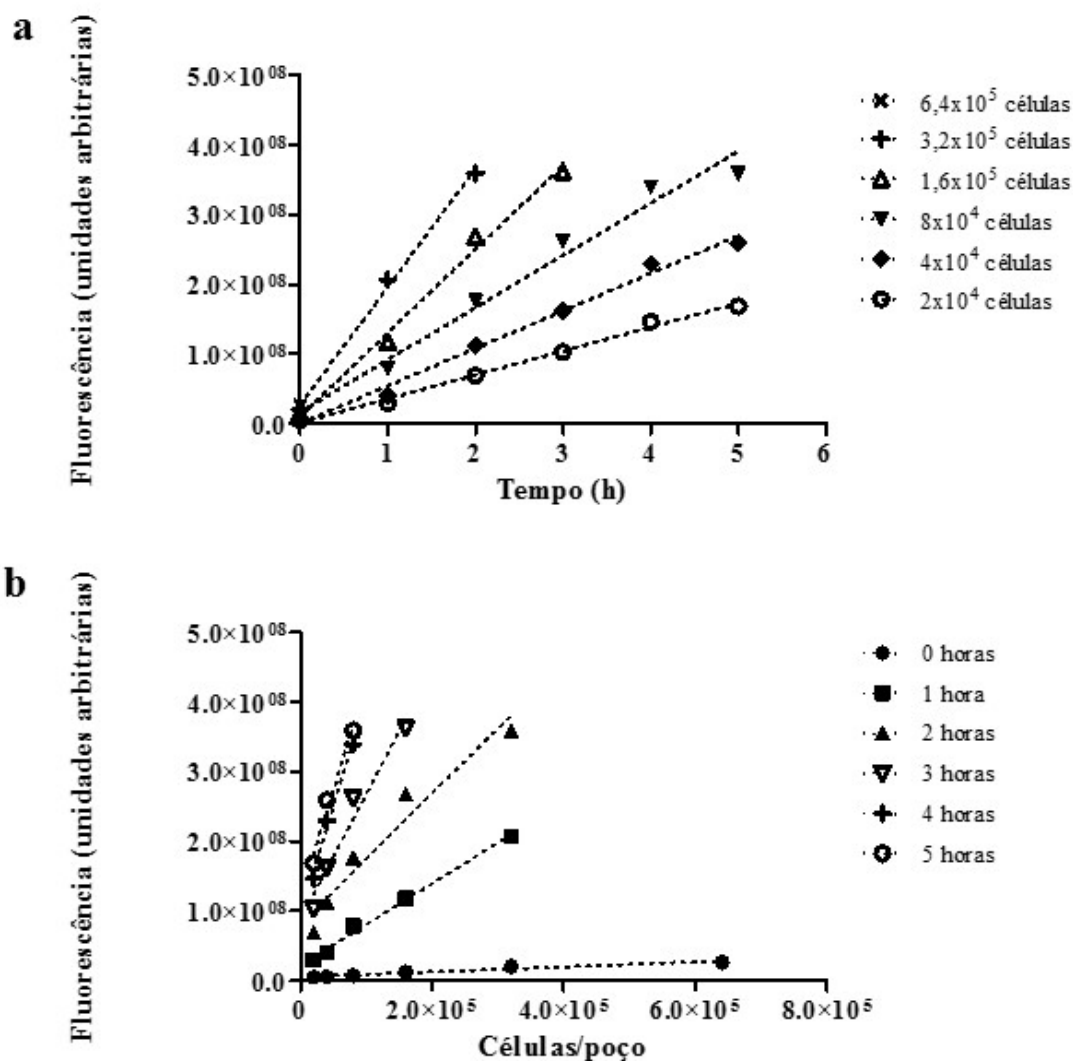


Figura 15: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 48h. Para determinar a viabilidade celular de diferentes concentrações de macrófagos (2×10^4 e $6,4 \times 10^5$ células/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina que emite fluorescência. Após 48h de incubação, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Após 72 h de incubação celular foi igualmente constatado que a fluorescência aumenta linearmente com o tempo (h) de contacto com a resazurina (Fig. 16). No entanto, para $6,4 \times 10^5$ e $3,2 \times 10^5$ células/poço e após 1 h, a fluorescência emitida é superior ao limite máximo de leitura do fluorímetro, não sendo possível de quantificar (Fig. 16a). Para as restantes concentrações após 4 e 5 h de adição da resazurina também não foi possível quantificar os níveis de fluorescência emitidos.

A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 superiores a 0,99, exceto quando foi utilizado 8×10^4 células/poço. Neste caso, o valor de r^2 foi inferior a 0,99.

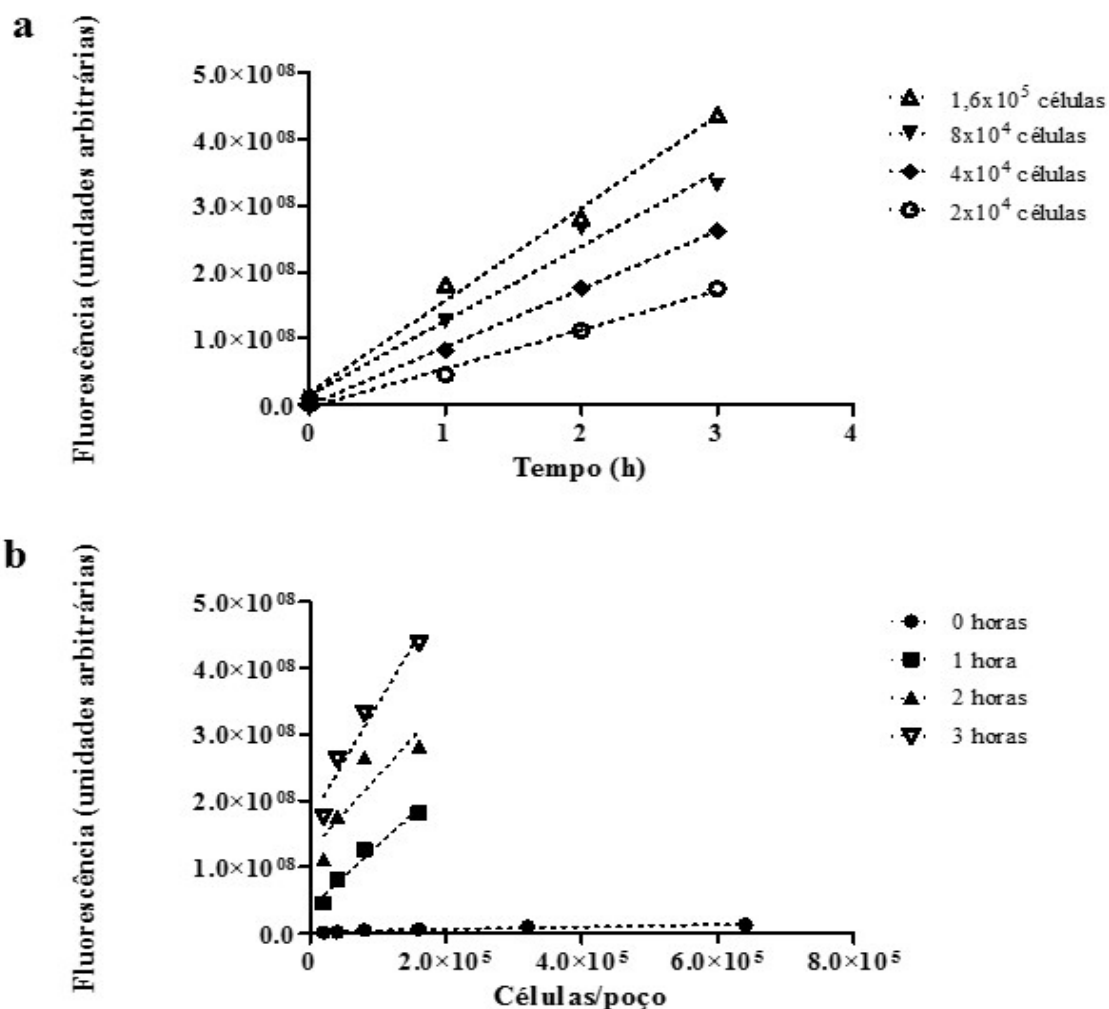


Figura 16: Níveis de viabilidade em macrófagos incubados durante 72h. Para determinar a viabilidade celular de diferentes concentrações de macrófagos (2×10^4 e $6,4 \times 10^5$ células/poço) foi utilizado a resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina que emite fluorescência. Após 72h de incubação, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Nas mesmas condições, a fluorescência é proporcional à densidade celular (Fig. 16b). A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração celular apresentou valores de r^2 a variar entre 0,77 e 0,98. Valores de r^2 superiores a 0,98 só foram determinados ao fim de 1h de incubação com a resazurina.

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h), foi considerado que a concentração de macrófagos mais adequada para os ensaios de citotoxicidade seria $1,6 \times 10^5$ células / poço. Nesta concentração de macrófagos, a fluorescência aumenta linearmente com o tempo (h) de contacto com a resazurina e apresenta valores de r^2 superiores a 0,99 nos três períodos em estudo (24, 48 e 72 h). A fluorescência emitida é também proporcional às diversas densidades celulares nos ensaios de 48 e 72 h. Tendo em conta este resultado e a duração do ciclo celular, foi considerado que os ensaios de citotoxicidade teriam a duração de 72 h e que a leitura dos resultados seria efetuada 1 h após a adição da resazurina, uma vez que após este período o valor de r^2 é superior a 0,98.

3.1.1. Avaliação da citotoxicidade dos EPI

Após a otimização do método da resazurina em macrófagos, os valores de 10 e 50% da concentração citotóxica (CC_{10} e CC_{50} , respetivamente) dos diferentes EPI foram determinados (Tabela 11). Estes valores representam a concentração necessária de cada EPI para provocar a morte a 10 e 50% das células, respetivamente.

Tabela 11: Determinação da citotoxicidade de EPI em macrófagos. A concentração citotóxica de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PABN em macrófagos (P388D1) foi determinada após 72 h de tratamento e após 1 h de incubação com a resazurina. Os valores de CC_{10} e CC_{50} resultantes de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

EPI	Macrófagos	
	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC_{10} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
TZ	0,963	0,107
VER	17,690	1,966
PZ	4,763	0,529
PMZ	5,748	0,639
ORT	37,200	4,130
PABN	$\geq 200,000$	$\geq 200,000$

Com base nos valores de citotoxicidade obtidos e com o intuito de minimizar danos celulares, as concentrações de CC₁₀, correspondente a 90% de viabilidade, de VER (1,966 µg.mL⁻¹), ORT (4,130 µg.mL⁻¹) e PAβN (≥200 µg.mL⁻¹) foram selecionadas para serem utilizadas na caracterização da internalização de fármacos e compostos por células infectadas por *Leishmania* spp. Por outro lado, os valores de CC₁₀ de TZ, PZ e PMZ foram inferiores a 1 µg.mL⁻¹, ou seja uma baixa concentração dos mesmos coloca em causa a viabilidade dos macrófagos, pelo que estes EPI não foram considerados nos estudos de internalização de fármacos.

3.2. Otimização do ensaio de viabilidade em parasitas do género *Leishmania*

A determinação da viabilidade dos parasitas foi efetuada utilizando resazurina. A citotoxicidade de diferentes concentrações de promastigotas (6,25×10⁴ a 2×10⁶) foi analisada em diversos períodos de tempo (24, 48 e 72 h) e após a adição da resazurina (0, 1, 2, 3, 4 e 5 h).

3.2.1. *L. infantum*

Após 24 h de incubação dos promastigotas de *L. infantum* seguida da adição da resazurina, a fluorescência emitida aumentou linearmente com o tempo (h) (Fig. 17a). Contudo, na concentração parasitária mais elevada (2×10⁶ promastigotas/poço) a fluorescência emitida ao fim de 4 e 5 h encontrava-se acima do limiar de deteção do fluorímetro, pelo que não foi quantificada. A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r² a variar entre 0,94 e 0,98. Nas concentrações de 1,25×10⁵ e 5×10⁵ parasitas/poço r² foi superior a 0,98. Após 2, 3, 4 e 5 h de incubação com a resazurina, a fluorescência aumentou também linearmente com o incremento do número de promastigotas (Fig. 17b). A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração de parasitas apresentou valores de r² a variar entre 0,85 e 0,99. Valores de r² superiores a 0,99 foram observados após 4 e 5 h de incubação.

Ao fim de 48 h, a fluorescência nas várias densidades parasitárias apenas aumentou linearmente com o tempo quando se utilizaram concentrações de parasitas entre 5×10⁵ e 2×10⁶ promastigotas/poço (valores não apresentados). Nestas condições, os valores de correlação linear variaram entre 0,88 e 0,99, sendo que este último valor

III. Resultados

corresponde à maior densidade utilizada (2×10^6). A fluorescência também não aumentou linearmente com a densidade celular nos vários períodos de tempo analisados. Ao fim de 72 h, a fluorescência nas várias densidades celulares não aumentou linearmente com o tempo nem com a concentração de promastigotas nos vários tempos descritos (valores não apresentados).

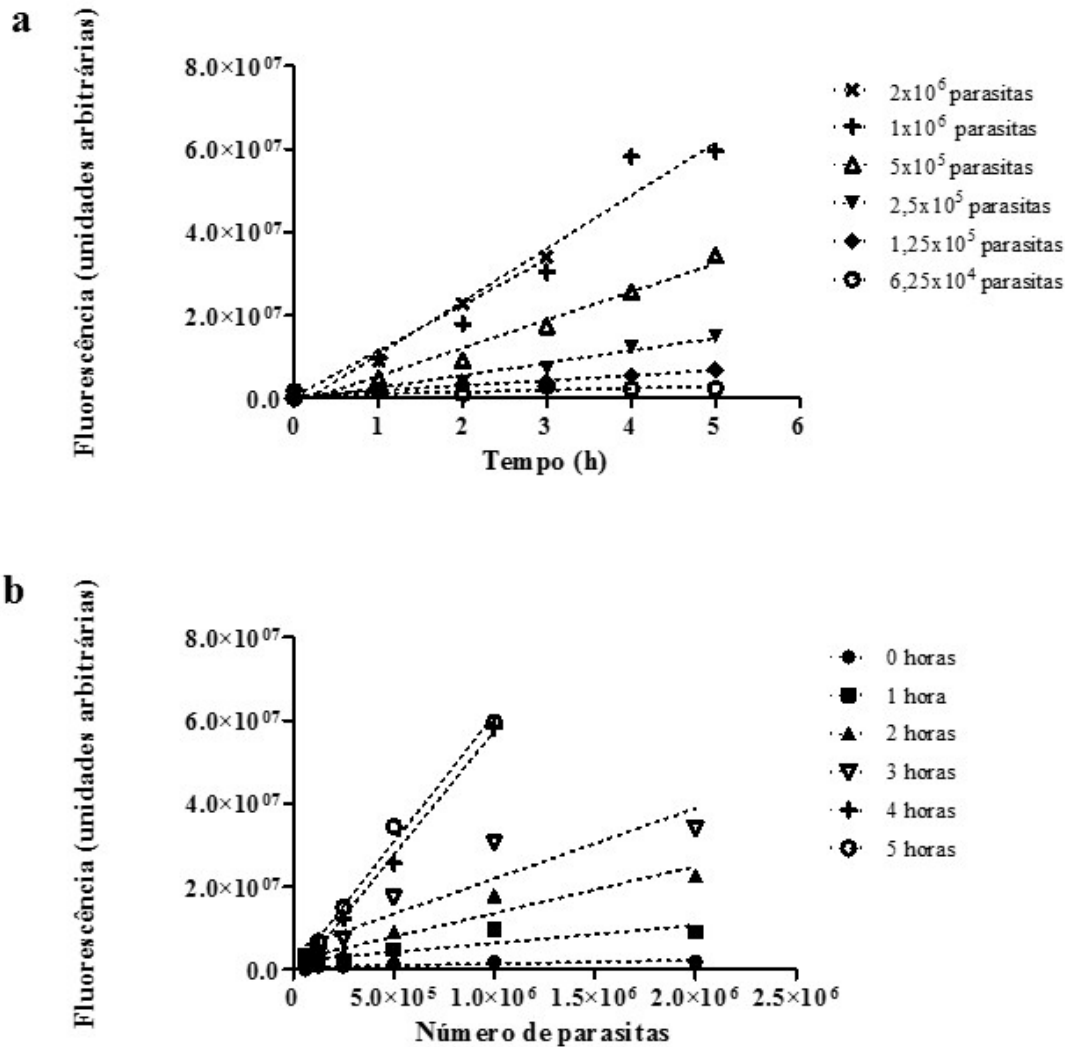


Figura 17: Níveis de viabilidade de promastigotas de *L. infantum* incubados durante 24h. Para determinar a viabilidade de diferentes concentrações de parasitas ($6,25 \times 10^4$ a 2×10^6 promastigotas/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina que emite fluorescência. Após 24 h, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas, foi determinado que os ensaios de citotoxicidade seriam realizados ao fim de 24 h. Este período de tempo foi escolhido por ser o único em que os níveis de fluorescência aumentavam linearmente em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas. Foi ainda determinado que a concentração mais favorável de promastigotas a utilizar nos ensaios de citotoxicidade seria 5×10^5 parasitas/poço devido à intensidade da fluorescência emitida e por apresentar valor de r^2 superior a 0,98. Foi também determinado que a leitura dos resultados seria efetuada 4 h após de adição da resazurina, uma vez que o valor de r^2 é superior a 0,99.

3.2.2. *L. amazonensis* (HOM)

Após 24 h de incubação das várias densidades de promastigotas da estirpe HOM de *L. amazonensis* e adição de resazurina, foi observado que a fluorescência emitida aumentou linearmente com o tempo (h) (Fig. 18a). No entanto, apesar da linearidade verificada nas menores concentrações parasitárias ($6,25 \times 10^4$ e $1,25 \times 10^5$) a fluorescência não foi quantificada após 4 h de contacto com a resazurina por ser inferior ao nível de deteção do fluorímetro. De igual modo, não foi possível quantificar o nível de fluorescência na maior concentração de parasitas (2×10^6) por ser superior ao nível de deteção do fluorímetro. A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,71 e 0,99. Na concentração 5×10^5 parasitas/poço r^2 é superior a 0,99. A fluorescência também aumentou linearmente com o aumento da densidade de parasitas, após 3, 4 e 5 h de incubação com a resazurina (Fig.18b). A análise por regressão linear da concentração de parasitas apresentou valores de r^2 a variar entre 0,84 e 0,99. Valores de r^2 superiores a 0,99 foram observados após 4 e 5 h de incubação.

Ao fim de 48 h, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo unicamente nas concentrações parasitárias mais elevadas (5×10^5 a 2×10^6). Nestas condições, a análise por regressão linear apresentou valores de r^2 a variar entre 0,93 e 0,96, sendo que este último valor apenas se verificou nos poços com 5×10^5 promastigotas. Na menor concentração parasitária ($6,25 \times 10^4$) os níveis de fluorescência foram inferiores ao limite

III. Resultados

de sensibilidade do fluorímetro pelo que não foram quantificados. Nas concentrações de $1,25 \times 10^5$ parasitas/poço, unicamente após 3 h de contacto com a resazurina foi possível obter leituras de fluorescência (valores não apresentados). Neste caso, a fluorescência não aumentou linearmente com a densidade celular.

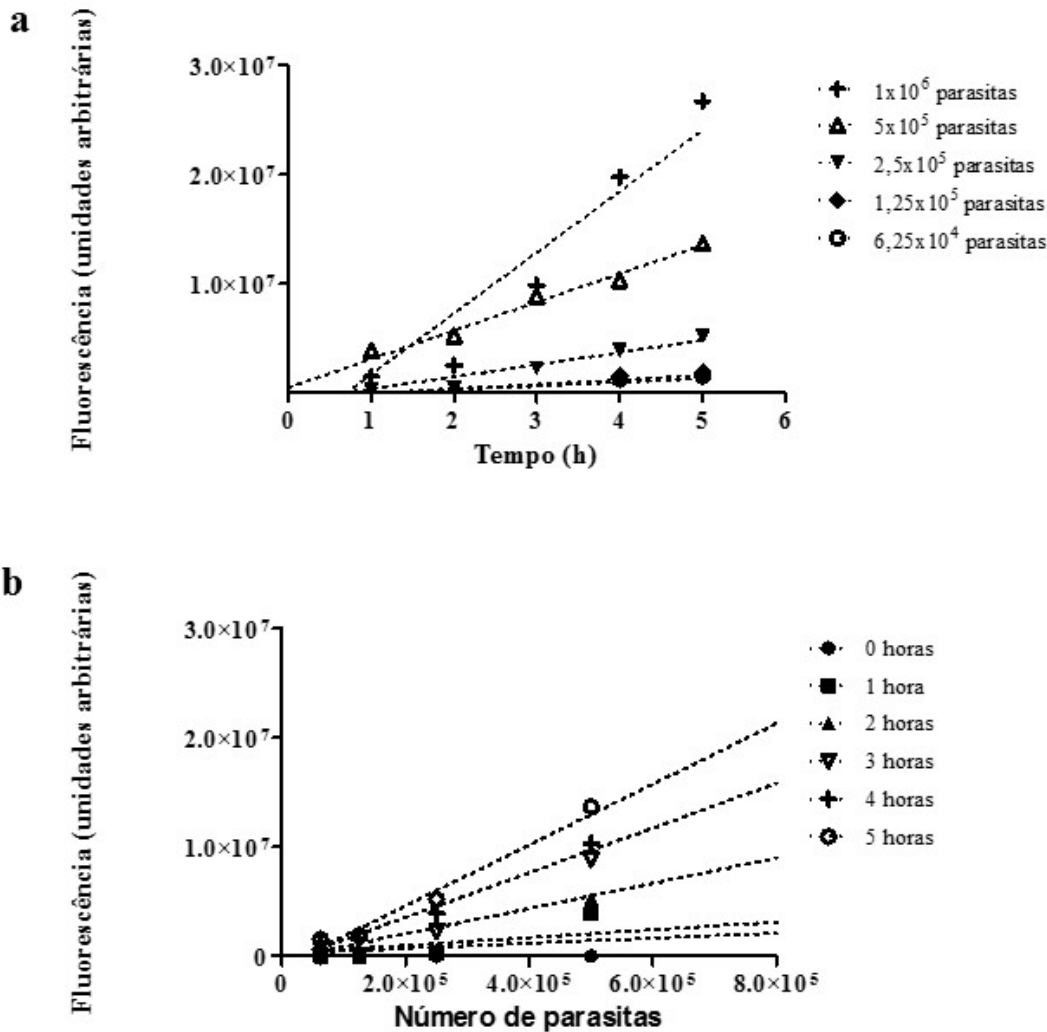


Figura 18: Níveis de viabilidade em promastigotas da estirpe HOM de *L. amazonensis* incubados durante 24h.

Para determinar a viabilidade de diferentes concentrações de parasitas ($6,25 \times 10^4$ a 2×10^6 promastigotas/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina, produto que emite fluorescência. Após 24 h, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Ao fim de 72 h, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo. No entanto, não foi quantificável na menor densidade em estudo ($6,25 \times 10^4$), após 3 h nas densidades

intermédias ($1,25 \times 10^5$ a 5×10^5) e após 1 h nas densidades mais elevadas (1×10^6 e 2×10^6). A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,77 e 0,97, sendo que este último valor apenas foi verificado em 1×10^6 parasitas/poço. Nestas condições, a fluorescência não aumentou com a densidade celular nos vários tempos descritos (valores não apresentados).

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas, foi determinado que os ensaios de citotoxicidade seriam realizados ao fim de 24 h. Este período foi escolhido por ser o único período em que os níveis de fluorescência aumentavam linearmente em função do tempo de contacto com a resazurina (h) e da concentração de parasitas. Foi também considerado mais adequado utilizar a concentração de 5×10^5 parasitas/poço nos ensaios de citotoxicidade devido à intensidade da fluorescência emitida e por apresentar valor de r^2 superior a 0,99. Por fim, foi ainda determinado que a leitura dos resultados seria efetuada 4 h após a adição da resazurina, uma vez que após este período o valor de r^2 é superior a 0,99.

3.2.3. *L. amazonensis* (PH)

Após 24 h de incubação dos promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis* seguido pela adição da resazurina, a fluorescência emitida apenas aumentou linearmente com o tempo com 5×10^5 e 1×10^6 parasitas (Fig.19a). Na densidade parasitária mais elevada (2×10^6) não foi possível quantificar a fluorescência emitida. Nas menores densidades estudadas ($6,25 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^5$), apenas após 4 e 5 h de contacto com a resazurina é possível determinar os níveis de fluorescência. A análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar variam entre 0,75 e 0,98. Sendo que este último valor foi verificado apenas em 5×10^5 parasitas (Fig. 19a). A fluorescência aumenta linearmente com o aumento da densidade celular também ao fim de 4 e 5 h (Fig. 19b). Em ambos os casos, a análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração parasitária originou valores de 0,99.

III. Resultados

Ao fim de 48 h, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo, exceto nas menores concentrações em que não foi possível quantificar a fluorescência ao longo de todo o ensaio ($6,25 \times 10^4$) ou após 3 h de incubação com a resazurina ($1,25 \times 10^5$).

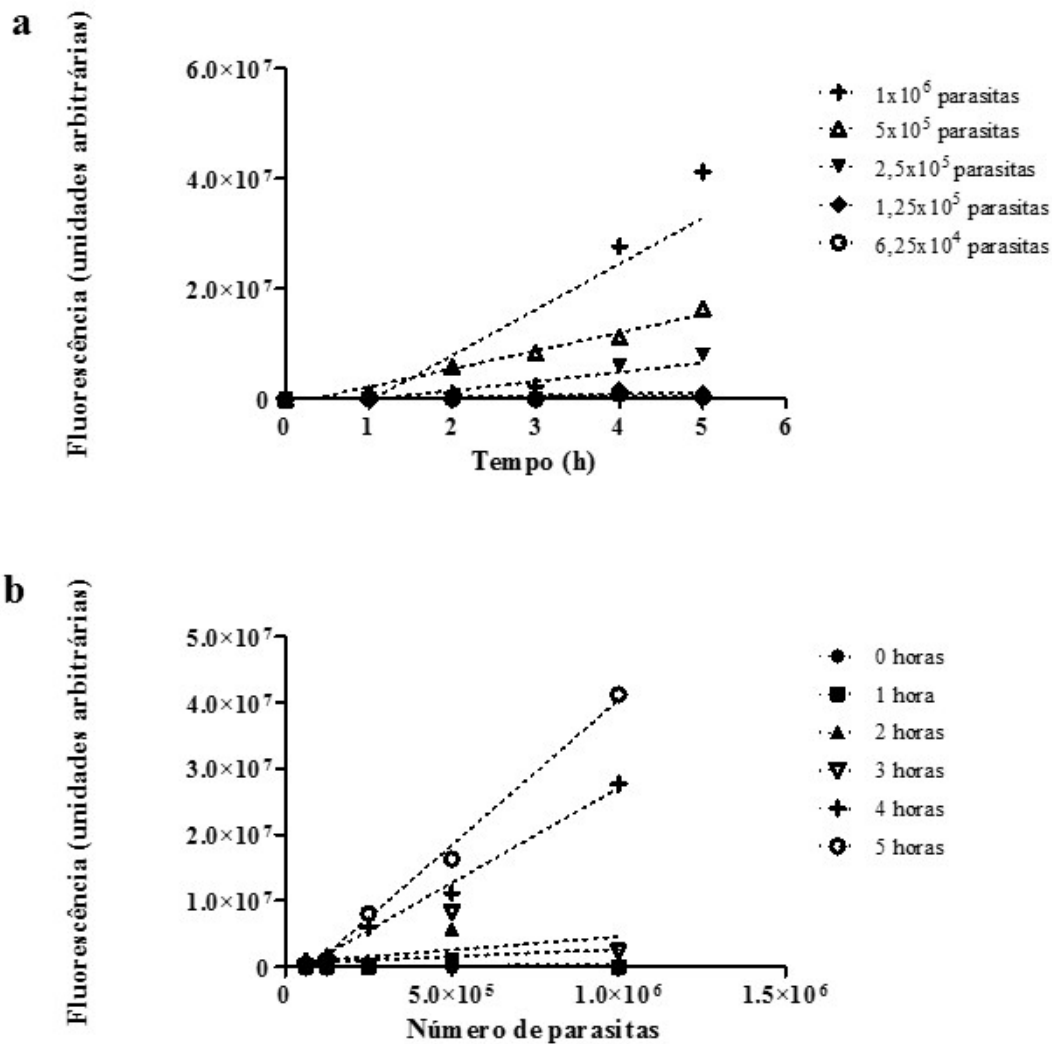


Figura 19: Níveis de viabilidade em promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis* incubados durante 24h. Para determinar a viabilidade de diferentes concentrações de parasitas ($6,25 \times 10^4$ a 2×10^6 promastigotas/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina, produto este que emite fluorescência. Após 24 h, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Nas restantes condições, a análise por regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,86 e 0,99, sendo que este último valor apenas foi verificado na concentração mais elevada de parasitas (2×10^6). A partir de

1 h de contacto com a resazurina, a fluorescência aumentou com a concentração de promastigotas. A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração de parasitas apresentou valores de r^2 a variar entre 0,78 e 0,94. Este último valor foi obtido após 3 h de incubação (valores não apresentados).

Ao fim de 72 h, a fluorescência aumentou linearmente com o tempo nas três maiores concentrações de parasitas (5×10^5 , 1×10^6 e 2×10^6). Contudo, nas concentrações inferiores, a fluorescência só foi quantificada ao fim de 4 h. A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração de parasitas apresentou valores de r^2 a variar entre 0,97 e 0,99. Este último valor foi verificado em 1×10^6 e 2×10^6 promastigotas/poço. Nestas condições, a fluorescência não aumentou linearmente com o aumento da densidade parasitária (valores não apresentados).

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas, foi determinado que os ensaios de citotoxicidade seriam realizados ao fim de 24 h de incubação. Este período foi escolhido por os níveis de fluorescência aumentarem linearmente em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas e por apresentar valores de r^2 apropriados. Foi ainda considerado que a concentração de promastigotas mais favorável seria 5×10^5 parasitas/poço devido à intensidade da fluorescência emitida e por apresentar r^2 superior a 0,98. Foi também determinado que a leitura dos resultados seria efetuada 4 h depois da adição da resazurina, uma vez que nestas condições r^2 é superior a 0,99.

3.2.4. *L. shawi*

Ao fim de 24 h de incubação de promastigotas de *L. shawi* seguida pela adição da resazurina, a fluorescência emitida aumentou linearmente com o tempo nas concentrações parasitárias em estudo (Fig. 20a). A fluorescência emitida por 2×10^6 promastigotas não foi quantificada por ultrapassar o limite de deteção do fluorímetro. Foi necessário que a resazurina estivesse em contacto com $6,25 \times 10^4$ parasitas durante 4 e 5 h para que fosse possível quantificar a fluorescência emitida. A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,88 e 0,99. Este último valor apenas se verificou em 5×10^5 parasitas. A fluorescência aumentou linearmente com a densidade parasitária às 3, 4 e 5 h (Fig. 20b). A análise de regressão

III. Resultados

linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 a variar entre 0,84 e 0,99. Às 4 e 5 h de contacto com a resazurina apresentaram r^2 igual a 0,99.

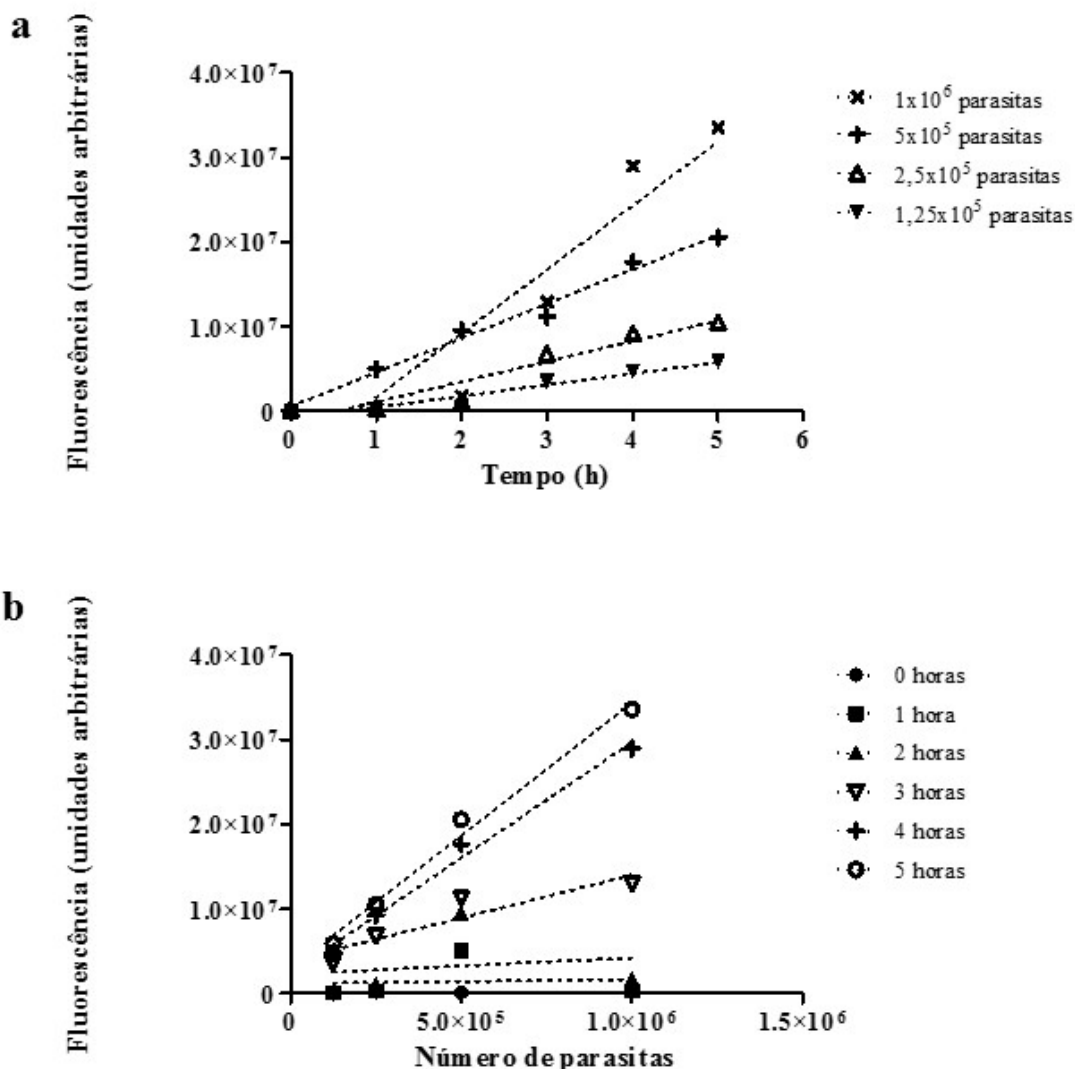


Figura 20: Níveis de viabilidade em promastigotas de *L. shawi* incubados durante 24h. Para determinar a viabilidade de diferentes concentrações de parasitas ($6,25 \times 10^4$ a 2×10^6 promastigotas/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina, produto este que emite fluorescência. Após 24 h, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

Após 48 h de incubação com 5×10^5 e 1×10^6 parasitas/poço, a fluorescência emitida aumentou linearmente com o tempo. A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou valores de r^2 igual a 0,95. Contudo, a fluorescência emitida por $6,25 \times 10^4$ e 2×10^6 não foi passível de ser quantificada. A

fluorescência aumentou linearmente com a concentração parasitária às 2, 3, 4 e 5 h. A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração parasitária apresentou valores de r^2 a variar entre 0,96 e 0,99. Após 4 h de contacto com a resazurina, r^2 tomou o valor de 0,99 (valores não apresentados). Após 72 h de incubação, a fluorescência emitida não aumentou linearmente com o tempo ou com a densidade celular (valores não apresentados).

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas, foi selecionado 24 h de incubação como o período de tempo mais adequado para os ensaios de citotoxicidade. Este período foi escolhido por os níveis de fluorescência aumentarem linearmente em função do tempo de contacto com a resazurina (h), da concentração de parasitas e por apresentar melhores valores de r^2 . Devido à intensidade da fluorescência emitida e por r^2 ser superior a 0,99, foi ainda determinado que 5×10^5 parasitas/poço seria a concentração de promastigotas mais favorável para usar nos ensaios de citotoxicidade. Foi ainda considerado que a leitura dos resultados seria efetuada após 4 h de adição da resazurina, uma vez que após este período o valor de r^2 é superior a 0,99.

3.2.5. *L. guyanensis*

Após 24 h de incubação de promastigotas de *L. guyanensis* seguida pela adição da resazurina, foi verificado que a fluorescência emitida aumentou linearmente com o tempo unicamente nos poços com 5×10^5 e 1×10^6 parasitas (Fig. 21a). A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo apresentou r^2 igual a 0,99 e 0,80, respetivamente. Não obstante, a fluorescência não foi possível de ser quantificada da maior concentração parasitária (2×10^6). A fluorescência aumentou linearmente com o aumento da concentração parasitária após 3, 4 e 5 h de contacto com a resazurina (Fig. 21b). A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração parasitária revelou valores de r^2 a variar entre 0,86 e 0,96. Após 4 h de contacto com a resazurina, r^2 tomou o valor de 0,96.

Após 48 h de incubação dos parasitas, a fluorescência não aumentou linearmente com o tempo nas diversas densidades celulares. A fluorescência emitida pelas duas densidades celulares mais elevadas não foi passível de ser quantificada. Porém, a

III. Resultados

fluorescência aumentou linearmente com o aumento da densidade parasitária, exceto às 4 e 5 h de contacto com a resazurina.

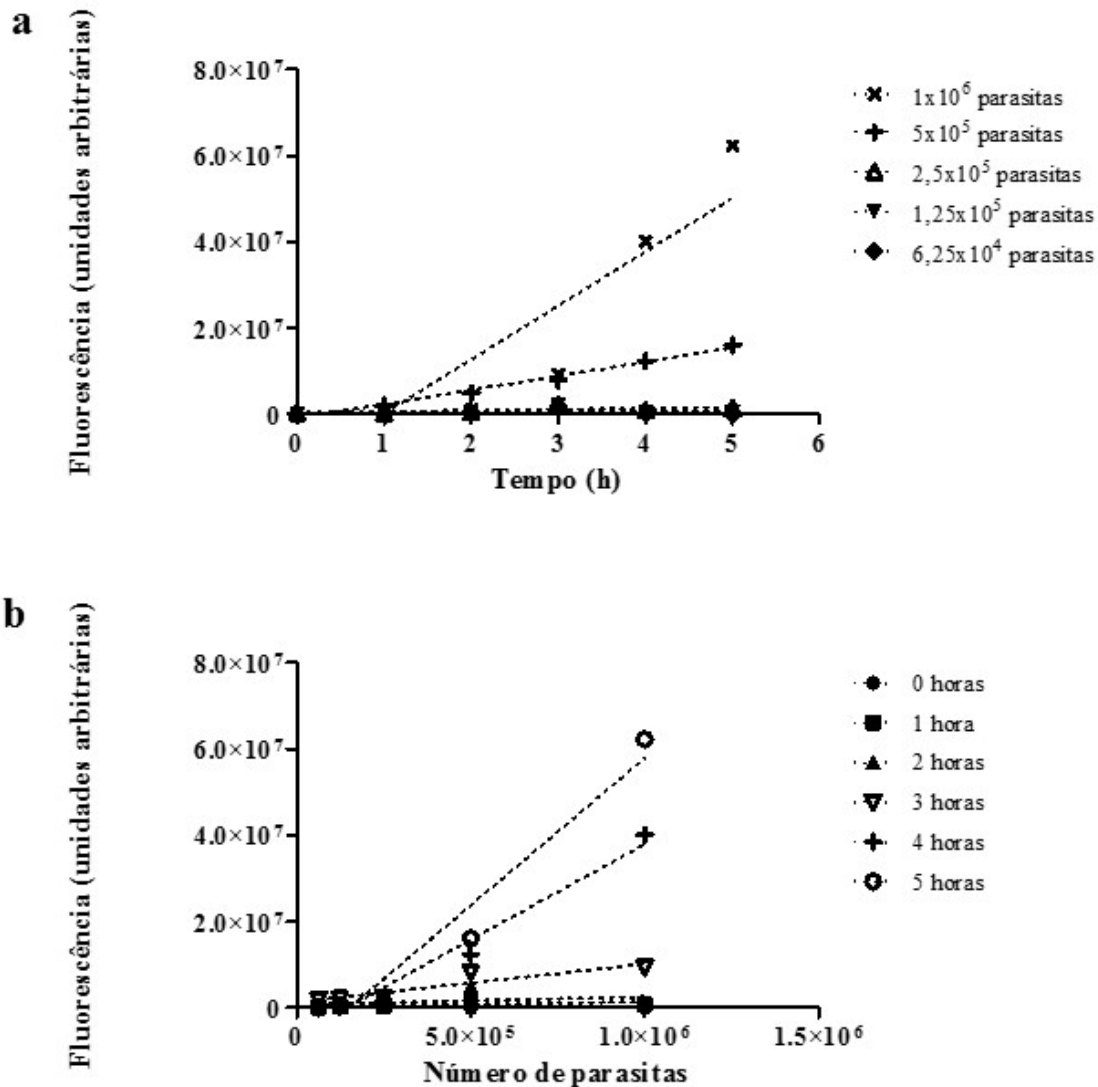


Figura 21: Níveis de viabilidade em promastigotas de *L. guyanensis* incubados durante 24h. Para determinar a viabilidade de diferentes concentrações de parasitas ($6,25 \times 10^4$ a 2×10^6 promastigotas/poço) foi utilizado resazurina que é metabolicamente reduzida a resorufina, produto este que emite fluorescência. Após 24 h, a fluorescência foi determinada imediatamente após a adição da resazurina (0) e às 1, 2, 3, 4 e 5 h. Os níveis de fluorescência em função do tempo (a) e das concentrações celulares (b) foram analisados por regressão linear. Os resultados expressam a média de três experiências independentes e de duas réplicas por amostra.

A análise de regressão linear dos níveis de fluorescência em função da concentração parasitária apresentou valores de r^2 a variar entre 0,84 e 0,97. A leitura no tempo 0 (imediatamente após a adição da resazurina) evidenciou r^2 igual a 0,97 (resultados não

apresentados). Ao fim de 72 h de incubação dos parasitas, a fluorescência não aumentou linearmente com o tempo ou com a concentração parasitária (resultados não apresentados).

Com base na análise da regressão linear dos níveis de fluorescência em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas foi determinado que os ensaios de citotoxicidade seriam realizados ao fim de 24 h. Este período foi escolhido por ser o único (24, 48 e 72 h) em que os níveis de fluorescência aumentavam linearmente em função do tempo de adição da resazurina (h) e da concentração de parasitas e que apresentava melhores valores de r^2 . Devido à intensidade da fluorescência emitida e por apresentar r^2 superior a 0,99, a concentração de 5×10^5 parasitas/poço foi escolhida. A leitura dos resultados será efetuada 4 h após a adição da resazurina uma vez que o valor de r^2 é superior a 0,96.

3.3. Avaliação da atividade antileishmania dos EPI

Após a otimização do método da resazurina, foram determinados os valores de 10 e 50% da concentração inibitória (IC₁₀ e IC₅₀, respetivamente) dos EPI em promastigotas do género *Leishmania*. A concentração a utilizar nos ensaios seguintes foi selecionada entre a mais baixa concentração de CC₁₀ e IC₁₀ obtida.

3.3.1. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ)

Os valores de IC₁₀ e IC₅₀ dos EPI (TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PABN) em promastigotas virulentos e avirulentos de *L. infantum* encontram-se representados na Tabela 12. Estes valores representam a concentração necessária para provocar a morte a 10 e 50% dos promastigotas.

Tendo em conta os valores de citotoxicidade obtidos em promastigotas virulentos de *L. infantum* e com o intuito de utilizar EPI que causem o mínimo de danos possíveis nos parasitas, nos estudos de caracterização da internalização de fármacos e compostos por células infetadas por *Leishmania* spp. foram selecionadas as concentrações de IC₁₀ de VER, PZ, PMZ e ORT. No entanto, apesar de aparentemente PZ e PMZ não possuírem atividade antileishmania, estes apresentam valores de CC₁₀ muito baixos (resultados apresentados anteriormente, Tabela 11) para os macrófagos. Estes EPI não foram

III. Resultados

considerados nos ensaios posteriores, uma vez que colocam em causa a viabilidade dos macrófagos. Por sua vez, TZ e PABN apresentam valores de IC₁₀ inferiores a 1 µg.mL⁻¹, indicando uma eventual atividade antileishmania mesmo na presença de reduzida concentração (µg.mL⁻¹). Não obstante, além do VER (CC₁₀) e do ORT (IC₁₀), aptou-se por utilizar também o PABN (IC₁₀) nos ensaios seguintes, uma vez que não é citotóxico para os macrófagos tendo em conta os resultados indicativos obtidos nos ensaios de acumulação de EtBr. É ainda de realçar que em promastigotas virulentos de *L. infantum*, o IC₅₀ dos EPI é superior quando comparados com promastigotas avirulentos, exceto quando o EPI é o ORT ou o PABN.

Tabela 12: Determinação da citotoxicidade de EPI em *L. infantum*. A citotoxicidade de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PABN em promastigotas virulentos e avirulentos foram determinados após 24 h de tratamento e após 4 h de contacto com a resazurina. Os valores de IC₅₀ e IC₁₀ resultantes de três experiências independentes e duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

EPI	<i>L. infantum</i> avirulentos		<i>L. infantum</i> virulentos	
	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)
TZ	2,811	0,312	6,415	0,713
VER	53,500	5,940	55,630	6,180
PZ	16,240	1,804	23,090	2,570
PMZ	26,530	2,950	32,950	3,660
ORT	29,130	3,240	20,640	2,293
PABN	23,250	2,580	4,979	0,553

3.3.2. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Os valores de IC₁₀ e IC₅₀ dos EPI (TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PABN) em promastigotas das estirpes HOM e PH de *L. amazonensis* encontram-se representados na Tabela 13. Estes valores indicam a concentração necessária para causar a morte de 10 e 50% promastigotas.

Tabela 13: Citotoxicidade de EPI em *L. amazonensis*. Os efeitos citotóxicos de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN em promastigotas das estirpes HOM e PH foram determinados após 24 h de tratamento e 4 h de contacto com a resazurina. Os valores de IC₅₀ e IC₁₀ resultantes de três experiências independentes e duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

EPI	<i>L. amazonensis</i> (HOM)		<i>L. amazonensis</i> (PH)	
	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)
TZ	2,346	0,260	1,664	0,185
VER	46,960	5,220	30,910	3,430
PZ	9,803	1,089	7,460	4,290
PMZ	7,080	0,786	5,124	0,569
ORT	13,040	1,338	38,640	0,829
PABN	103,300	11,478	≥200	≥200

De forma a reduzir possíveis danos nos parasitas foram selecionadas as concentrações de VER, PZ, ORT e PAβN respeitantes ao IC₁₀ que serão utilizadas na caracterização da internalização de fármacos e compostos por células infetadas por *Leishmania* spp. No entanto, apesar de aparentemente PZ não possuir atividade antileishmania, apresenta valores de IC₁₀ para macrófagos muito baixos (resultados apresentados anteriormente, Tabela 11), sendo eliminada dos ensaios posteriores, uma vez coloca em causa a viabilidade dos macrófagos. Por sua vez, TZ e PMZ apresentam valores de IC₁₀ inferiores a 1 µg.mL⁻¹, indicando uma eventual atividade antileishmania. Nos ensaios seguintes, serão utilizadas as concentrações de CC₁₀ de VER e de IC₁₀ de ORT e PAβN. Exceto na estirpe PH de *L. amazonensis* em que será utilizada a concentração de 25 µg.mL⁻¹ de PAβN, uma vez que foi uma das concentrações utilizadas nos ensaios de acumulação de EtBr e não apresenta danos quer para o parasita quer para o macrófago.

A estirpe HOM de *L. amazonensis* apresenta CC₅₀ dos EPI superior quando comparados com promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis*, exceto para o ORT e PAβN. Verifica-se ainda que as estirpes de *L. amazonensis* apresentam IC₅₀ dos EPI

III. Resultados

inferior quando comparados com promastigotas virulentos de *L. infantum* exceto quando o EPI é o PAβN e o ORT no caso da estirpe HOM de *L. amazonensis*.

3.3.3. Sub-género *Viannia* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Os valores de IC₁₀ e IC₅₀ dos EPI (TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN) em promastigotas de *L. shawi* e *L. guyanensis* encontram-se representados na Tabela 14. Estes valores representam a concentração necessária de cada EPI para causar a morte a 10 e 50% dos promastigotas.

Tabela 14: Citotoxicidade dos EPI em *L. shawi* e *L. guyanensis*. Os efeitos citotóxicos de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN em promastigotas foram determinados após 24 h de tratamento e 4 h de contacto com a resazurina. Os valores de IC₅₀ e IC₁₀ resultantes de três experiências independentes e duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

EPI	<i>L. shawi</i>		<i>L. guyanensis</i>	
	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IC ₁₀ (µg.mL ⁻¹)
TZ	1,931	0,215	1,835	0,213
VER	32,770	3,640	47,370	5,250
PZ	15,570	1,730	10,83	1,200
PMZ	11,100	1,230	7,578	1,230
ORT	52,310	5,810	15,760	1,750
PAβN	92,060	10,223	52,980	5,887

Tendo por base os valores de citotoxicidade obtidos e com o intuito de minimizar possíveis danos nos parasitas, selecionaram-se as concentrações respeitantes aos IC₁₀ de VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN para serem utilizadas na caracterização da internalização de fármacos e compostos por células infetadas por *Leishmania* spp. No entanto, apesar de aparentemente PZ e PMZ não possuírem atividade antileishmania, apresentaram valores de CC₁₀ em macrófagos muito reduzidos (resultados apresentados anteriormente, Tabela 11), tendo sido eliminados dos ensaios posteriores uma vez que colocam em causa a viabilidade dos macrófagos. Por sua vez, TZ apresentou valores de CC₁₀ inferiores a 1

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando uma eventual atividade antileishmania. Para os ensaios seguintes foram selecionadas as concentrações de CC_{10} de VER, IC_{10} de PABN e de CC_{10} e IC_{10} de ORT em *L. shawi* e *L. guyanensis*, respetivamente.

Em promastigotas de *L. shawi*, o IC_{50} dos EPI foram superiores aos encontrados para *L. guyanensis*, com exceção do VER. Foi também verificado que *L. shawi* e *L. guyanensis* apresentaram IC_{50} inferiores aos determinados para promastigotas virulentos de *L. infantum*, com exceção do ORT e PABN.

3.4. Determinação do índice de seleção dos EPI

Com o intuito de avaliar se os diferentes EPI apresentavam toxicidade reduzida para os macrófagos e/ou atividade antileishmania foi determinado o índice de seleção (IS) (Tabela 15). Os valores do IS indicaram que ORT e PABN são os EPI com maior seletividade para o parasita, uma vez que apresentaram menor citotoxicidade quando comparados com os restantes EPI.

Tabela 15: Índice de seleção dos EPI em promastigotas do subgénero *Leishmania* e *Viannia*. Os índices de seleção (IS) de TZ, VER, PZ, PMZ, ORT e PABN foram determinados para promastigotas virulentos e avirulentos de *L. infantum*, para promastigotas das estirpes HOM e PH de *L. amazonensis* e para promastigotas de *L. shawi* e *L. guyanensis*.

	Índice de Seleção (IS)					
	Sub-género <i>Leishmania</i>				Sub-género <i>Viannia</i>	
	<i>L. infantum</i> avirulentos	<i>L. infantum</i> virulentos	<i>L. amazonensis</i> (HOM)	<i>L. amazonensis</i> (PH)	<i>L. shawi</i>	<i>L. guyanensis</i>
TZ	0,3	0,2	0,4	0,6	0,5	0,5
VER	0,3	0,3	0,4	0,6	0,5	0,4
PZ	0,3	0,2	0,5	0,6	0,3	0,4
PMZ	0,2	0,2	0,5	1,1	0,5	0,8
ORT	1,3	1,8	2,8	1,0	0,7	2,4
PABN	>8,6	>40,2	>1,9	>1,0	>2,2	>3,8

4. Avaliação da citotoxicidade e atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos

4.1. Níveis de citotoxicidade de fármacos clássicos e de novos compostos com atividade antileishmania

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos diferentes fármacos e de novos compostos antileishmania em macrófagos (P388D1), o CC_{50} e CC_{10} foram determinados (Tabela 16). Estes valores representam a concentração necessária para provocar a morte a 10 e 50% das células.

Tabela 16: Citotoxicidade de fármacos e novos compostos em macrófagos. Os efeitos citotóxicos dos fármacos antileishmania clássicos, antimoniato de meglumina e miltefosina, e dos compostos ácido ursólico, CH8 e quercetina e a associação de ácido oleanólico e ácido ursólico em macrófagos (P388D1) foram determinados após 72 h de tratamento e 1 h de contacto com a resazurina. Os valores de CC_{50} e CC_{10} resultantes de três experiências independentes e duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

Compostos	Macrófagos	
	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC_{10} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Antimoniato de meglumina	>500,000	>500,000
Miltefosina	25,470	2,830
Ácido oleanólico e ursólico	0,845	0,094
Ácido ursólico	0,822	0,091
Chalcona (CH8)	>65,800	>65,800
Quercetina	13,670	1,520

Com o intuito de reduzir possíveis danos celulares foram selecionadas as concentrações respeitantes ao CC_{10} dos diferentes fármacos e compostos a serem utilizadas nos ensaios de internalização de fármacos e novos compostos por macrófagos parasitados. Verificou-se que o ácido ursólico e a associação ácido oleanólico e ursólico são os compostos que apresentam maior citotoxicidade, enquanto que o antimoniato de meglumina e a CH8 apresentam citotoxicidade reduzida quando comparados com os restantes compostos.

4.2. Atividade antileishmania de fármacos clássicos e novos compostos

A atividade exercida pelos diferentes fármacos e novos compostos em *Leishmania* spp. foi determinada através do cálculo do IC₅₀ (Tabela 17). Estes valores representam a concentração necessária para provocar a morte a 50% dos promastigotas.

Tabela 17: Efeito de fármacos e novos compostos em *Leishmania* spp. Os efeitos citotóxicos dos fármacos antileishmania clássicos, antimoniato de meglumina e miltefosina, e dos compostos ácido ursólico, CH8 e quercetina e a associação de ácido oleanólico e ácido ursólico foram determinados em promastigotas virulentos de *L. infantum*, promastigotas das estirpes HOM e PH de *L. amazonensis* e em promastigotas de *L. shawi* e *L. guyanensis* após 24 h de tratamento e 4 h de contacto com a resazurina. Os valores de IC₅₀ resultantes de três experiências independentes e duas réplicas por amostra foram determinados com o *software* GraphPad Prism.

	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)				
	Sub-género <i>Leishmania</i>			Sub-género <i>Viannia</i>	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i> (HOM)	<i>L. amazonensis</i> (PH)	<i>L. shawi</i>	<i>L. guyanensis</i>
Antimoniato de meglumina	>500,000	>500,000	>500,000	>500,000	>500,000
Miltefosina	9,448	4,528	6,031	5,789	5,669
Ácido oleanólico e ursólico	4,307	>100,000	8,711	3,707	14,570
Ácido ursólico	2,342	20,550	5,946	5,090	16,250
Chalcona (CH8)	0,583	5,679	0,591	0,476	37,690
Quercetina	31,730	4,110	4,861	37,200	38,710

Após análise dos valores de IC₅₀ dos diferentes fármacos e compostos obtidos em promastigotas, a miltefosina, o ácido ursólico, a CH8 e a quercetina foram selecionados para os ensaios de caracterização da internalização de fármacos e compostos por células

III. Resultados

infetadas por *Leishmania* spp. O antimoniato de meglumina não será utilizado por não ter sido possível determinar o IC₅₀. De igual modo, a associação ácido ursólico e oleanólico foi excluída por não existirem diferenças importantes quando comparados com parasitas tratados unicamente com ácido ursólico.

4.3. Índice de seleção (IS) de fármacos clássicos e novos compostos

De forma a avaliar se os diferentes fármacos e novos compostos apresentavam toxicidade reduzida para as células e atividade antileishmania, foi determinado o IS (Tabela 18).

Tabela 18: Índice de seleção de fármacos clássicos e novos compostos. Os índices de seleção (IS) dos fármacos antileishmania clássicos, antimoniato de meglumina e miltefosina, e dos compostos ácido ursólico, CH8 e quercetina e a associação de ácido oleanólico e ácido ursólico foram determinados.

	Índice de Seleção (IS)				
	Sub-género <i>Leishmania</i>			Sub-género <i>Viannia</i>	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i> (HOM)	<i>L. amazonensis</i> (PH)	<i>L. shawi</i>	<i>L. guyanensis</i>
Antimoniato de meglumina	n.d. ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Miltefosina	2,7	5,6	4,2	4,4	4,5
Ácido oleanólico e ursólico	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1
Ácido ursólico	0,4	0,0	0,1	0,2	0,1
Chalcona (CH8)	112,9	11,6	111,3	138,2	1,7
Quercetina	0,4	3,3	2,8	0,4	0,4

³ Não determinado

Os valores de IS obtidos, indicam que miltefosina e CH8 apresentaram maior seletividade para o parasita, quando comparados com os restantes fármacos e compostos. O ácido ursólico e a combinação ácido oleanólico e ursólico revelaram seletividade reduzida para *Leishmania* spp.

5. Caracterização da internalização de fármacos clássicos e novos compostos por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp.

5.1. Infecção de macrófagos

A percentagem de macrófagos infetados com parasitas do subgénero *Leishmania* e *Viannia* e o número de parasitas intracelulares por macrófago foi determinada utilizando as proporções macrófago:parasita de 1:3 e 1:5 para 5, 18, 24 e 48 h de incubação das células com promastigotas.

5.1.1. *L. infantum*

A percentagem de macrófagos infetados na proporção 1:3 (macrófago:parasita) foi superior à percentagem na proporção 1:5 às 5 e 18 h de incubação. Às 24 h as percentagens foram idênticas e às 48 h o número de macrófagos infetados foi superior na proporção 1:5 (3%) (Fig. 22a). Às 5 e 18 h de incubação, a percentagem de macrófagos infetados na proporção 1:3 foi idêntica. Sendo que às 24 h houve decréscimo de células infetadas (1%) e às 48 h ocorreu um ligeiro aumento. Na proporção 1:5, a percentagem de células infetadas variou entre 1 e 2%. Unicamente às 48 h de contacto entre células e parasitas foi atingida a maior percentagem (3%) de células infetadas (Fig. 22a). Na proporção de 1 macrófago:3 parasitas foi verificado que cada célula parasitada possuía entre 1 e 2 amastigotas. Apenas às 48 h, o número de parasitas intracelulares aumentou ligeiramente (Fig. 22b, c, d, e). Por sua vez, na proporção 1:5 o número de parasitas por macrófago é constante (1%) ao longo do tempo.

Tendo em conta os resultados obtidos foi determinado que a proporção de 1 macrófago:3 parasitas seria a escolhida para os ensaios seguintes e que o tempo de incubação seria 5 h, uma vez que é a proporção e o período de tempo em que é alcançado a maior percentagem de macrófagos infetados.

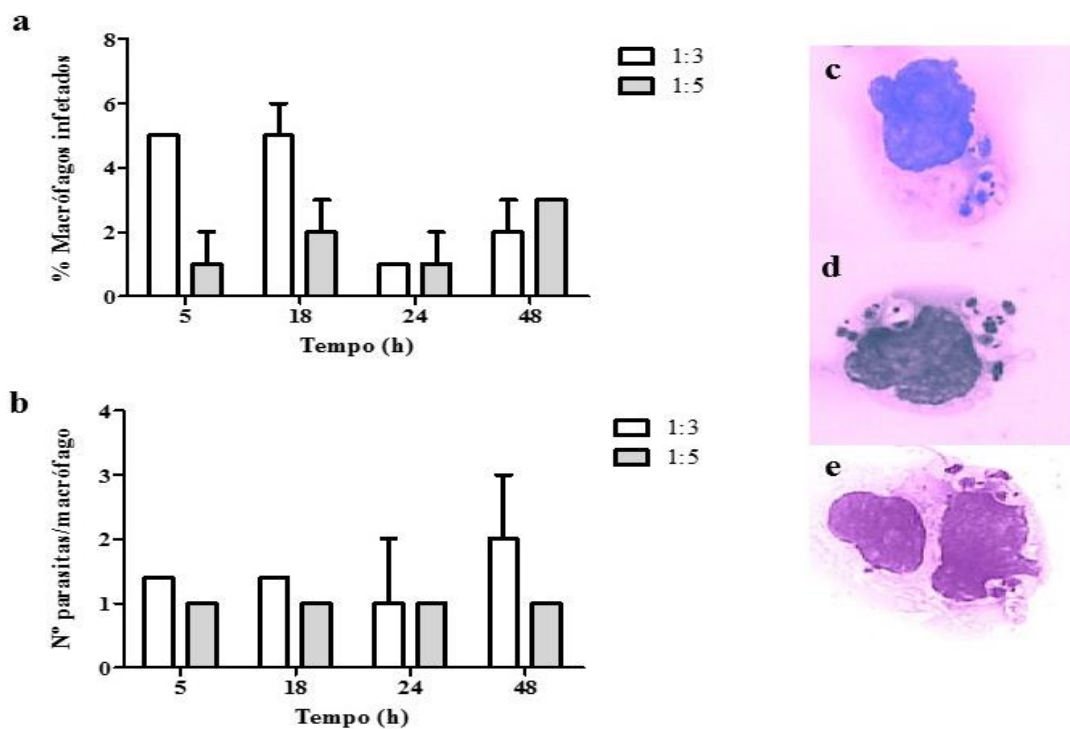


Figura 22: Infecção de macrófagos por promastigotas virulentos de *L. infantum*. A percentagem de macrófagos infectados (a) e o número médio de amastigotas intracelulares por cada macrófago (b) foi determinado às 5, 18, 24 e 48 h por observação ao microscópio ótico de lâminas de *cytospin* coradas com Giemsa. Foram utilizadas as proporções iniciais de infecção de 1:3 e 1:5 macrófago:parasita. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes. Imagens de macrófagos infectados obtidas por microscopia ótica (1000 \times) são apresentadas a título exemplificativo: c - 1:3, 18 h; d - 1:5, 24 h; e - 1:3, 48 h.

5.1.2. *L. amazonensis* (HOM)

A percentagem de macrófagos infectados com promastigotas da estirpe HOM de *L. amazonensis* diminuiu ao longo do tempo em ambas as proporções (1:3 e 1:5). O número de macrófagos infectados foi também superior na proporção 1:3 quando comparada com 1:5, ao longo do tempo. A maior percentagem de infecção foi determinada às 5 h, para ambas as proporções macrófago:parasita utilizadas (Fig. 23a), com 12 e 9% de infecção em 1:3 e 1:5, respetivamente.

Na proporção 1:3, o número de amastigotas intracelulares por macrófago variou entre 2 e 4. Na proporção de 1:5, os macrófagos apresentaram entre 1 e 2 parasitas por célula (Fig. 23b, c, d, e). Tendo em conta os resultados foi definido que a proporção a utilizar nos ensaios seguintes seria 1 macrófago:3 parasitas e que o tempo de incubação a

utilizar seria 5 h, por ser a proporção e o período de tempo em que se verificou maior percentagem de macrófagos infetados.

Comparativamente com *L. infantum*, esta estirpe de *L. amazonensis* revelou maior capacidade de infetar a linha celular, refletida no número de células infetadas e de parasitas intracelulares.

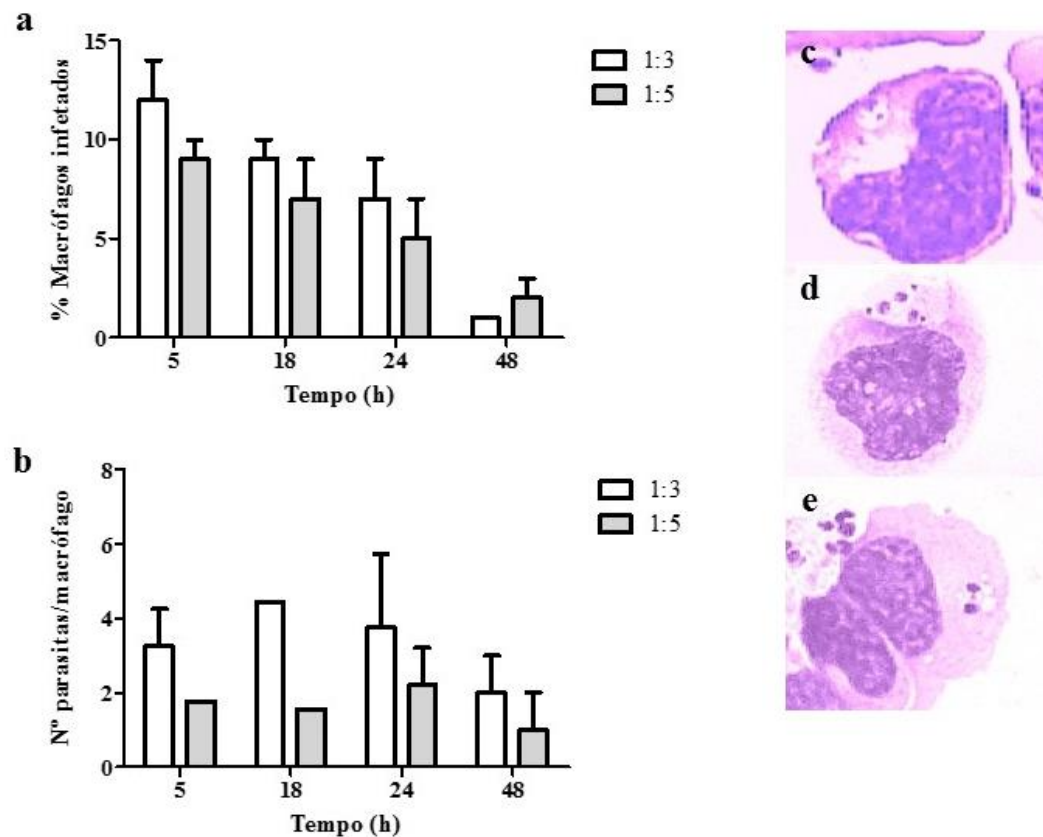


Figura 23: Infecção de macrófagos por promastigotas da estirpe HOM de *L. amazonensis*. A percentagem de macrófagos infetados e o número médio de amastigotas intracelulares por cada macrófago foi determinado às 5, 18, 24 e 48h por observação ao microscópio ótico de lâminas de *cytopsin* coradas com Giemsa. Foram utilizadas as proporções iniciais de infecção de 1:3 e 1:5 macrófago:parasita. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes. Imagens de macrófagos infetados obtidas por microscopia ótica (1000 \times) são apresentadas a título exemplificativo: c - 1:5, 18 h; d- 1:5, 24 h; e- 1:3, 48 h.

5.1.3. *L. amazonensis* (PH)

A percentagem de macrófagos infetados com promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis* na proporção 1 macrófago: 3 parasitas foi sempre superior à proporção 1:5 (Fig. 24a). O número de macrófagos parasitados aumentou ao longo do tempo, atingindo o máximo às 48h de observação (16%). Na proporção 1:5, apenas foi observado células

III. Resultados

infetadas às 24 h (1%) (Fig. 24b, e) e 48 h (8%). Na proporção 1:5, foi verificado o predomínio de parasitas extracelulares às 5 e 18 h (Fig. 24c, d). Na proporção 1 macrófago:3 parasitas, os macrófagos continham 1 ou 2 amastigotas. Porém na proporção 1:5 o número de parasitas por macrófago atingiu valores máximos às 48 h de incubação (Fig. 24b, c, d, e).

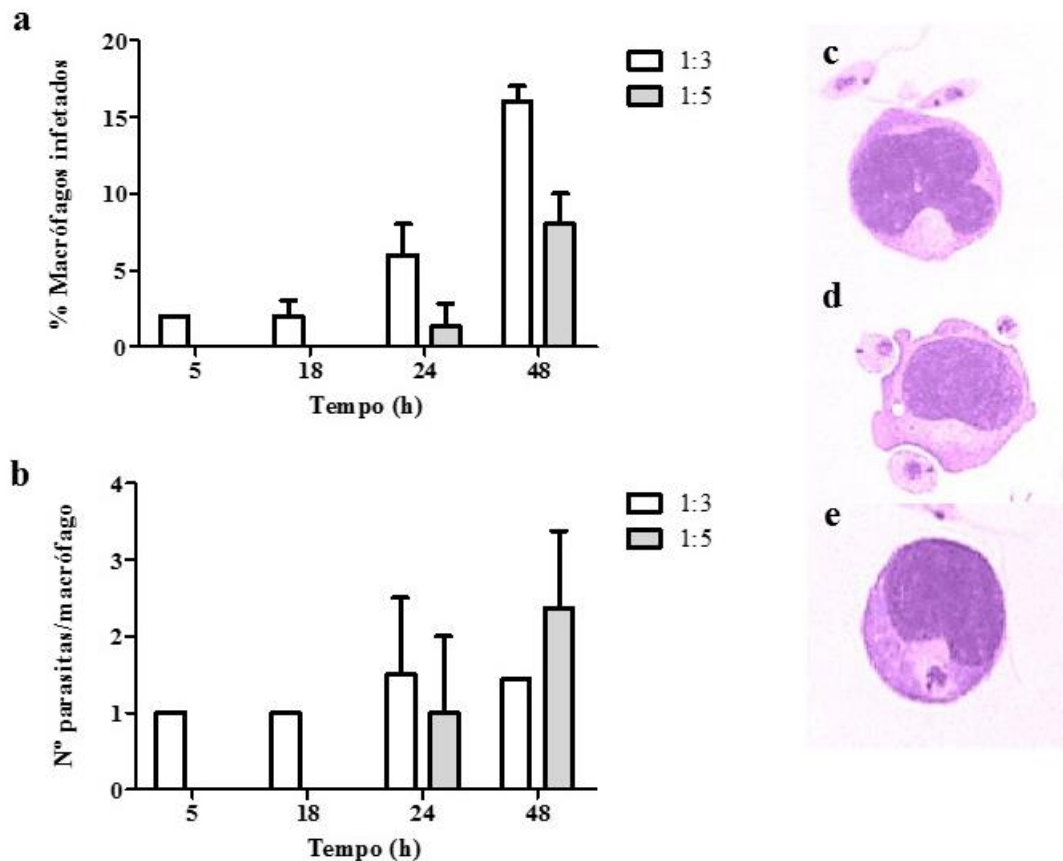


Figura 24: Infecção de macrófagos por promastigotas da estirpe PH de *L. amazonensis*. A percentagem de macrófagos infetados e o número médio de amastigotas intracelulares foi determinado às 5, 18, 24 e 48 h por observação ao microscópio ótico de lâminas de *cytospin* coradas com Giemsa. Foram utilizadas as proporções iniciais de infecção de 1:3 e 1:5 macrófago:parasita. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes. Imagens de macrófagos infetados obtidas por microscopia ótica (1000×) são apresentadas a título exemplificativo: c - 1:5, 5 h; d- 1:5, 18 h; e - 1:5, 24 h.

Tendo em conta os resultados obtidos foi definido que a proporção a utilizar nos ensaios seguintes seria de 1 macrófago:3 parasitas e que o tempo de incubação a utilizar seria 48 h, por ser a proporção e o período de tempo em que a maior percentagem de macrófagos infetados se verificou.

Em comparação com a estirpe HOM, a estirpe PH apresentou reduzida percentagem de células infetadas e do número de parasitas intracelulares, apontando uma menor capacidade de infecção dos macrófagos.

5.1.4. *L. shawi*

Em macrófagos infetados com *L. shawi*, após 5 h de incubação foi verificado maioritariamente a presença de parasitas extracelulares (Fig. 25c). Apenas se observou infecção de macrófagos após 18 h de incubação, sendo idêntico o número médio (2%) de macrófagos infetados nas proporções 1:3 e 1:5 (macrófago:parasita) (Fig. 25a).

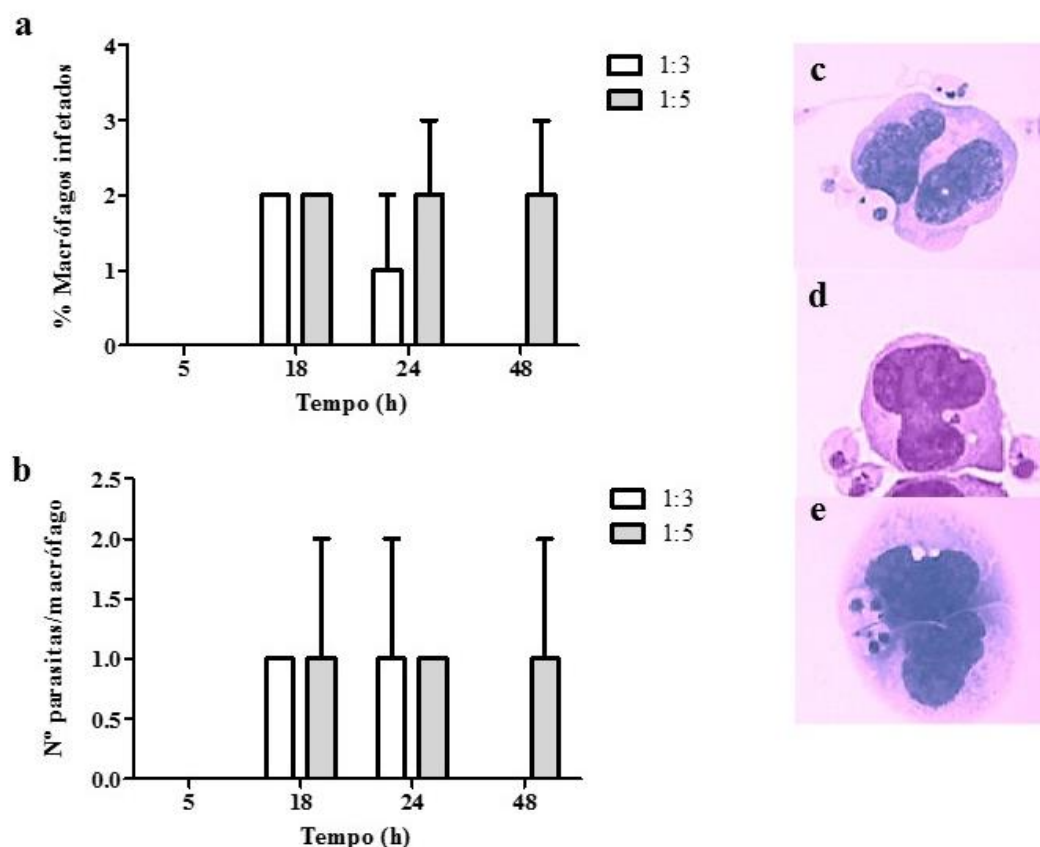


Figura 25: Infecção de macrófagos por promastigotas de *L. shawi*. A percentagem de macrófagos infetados e o número médio de amastigotas intracelulares por cada macrófago (P388D1) foi determinado às 5, 18, 24 e 48 h por observação ao microscópio ótico de lâminas de *cytospin* coradas com Giemsa. Foram utilizadas as proporções iniciais de infecção de 1:3 e 1:5 macrófago:parasita. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes. Imagens de macrófagos infetados obtidas por microscopia ótica (1000×) são apresentadas a título exemplificativo: c- 1:3, 5 h; d- 1:5, 18 h e 1:3, 24 h.

III. Resultados

Após 48 h de infecção, a percentagem de células infetadas na proporção de 1:3 foi próxima de zero, enquanto na proporção de 1:5, o número de células infetadas manteve-se constante. No período de infecção que decorreu entre as 18 e às 48 h os macrófagos infetados apresentaram em média um amastigota intracelular, independentemente das proporções macrófago:parasita iniciais (Fig. 25b, d, e).

Com base nestes resultados, foi determinado que a proporção a utilizar seria de 1 macrófago:3 parasitas e que o período de incubação seria 18 h, uma vez que nos períodos seguintes se verificou diminuição da percentagem de macrófagos infetados, enquanto que o número médio de parasitas por macrófago se manteve constante.

5.1.4. *L. guyanensis*

Apenas foi observado macrófagos infetados com *L. guyanensis* a partir das 18 h de incubação (Fig. 26a, c). Às 18h, a percentagem de macrófagos infetados na proporção 1:3 macrófago: parasita foi ligeiramente inferior (1%) quando comparado com a proporção 1:5 (2%). Porém, a partir deste tempo de observação a percentagem de infecção mostrou-se idêntica (3%), independentemente da proporção de infecção utilizada inicialmente (Fig. 26a). O número médio de um amastigota por macrófago foi obtido em todos os tempos de observação e independente da proporção inicial (Fig. 26d, e), com exceção das 18 h na proporção 1:5 em que se verificou um ligeiro aumento (1,5) (Fig. 26b).

Assim, tendo em conta os resultados obtidos foi definido que nos ensaios seguintes seria utilizado de 1 macrófago:3 parasitas e que o tempo de incubação seria 24 h, por ser a proporção e o período em que se verificou a maior percentagem de macrófagos infetados e por não haver alterações no tempo de observação seguinte (48h).

Comparativamente às espécies do subgénero *Leishmania*, as espécies do subgénero *Vianna* analisadas no presente trabalho demoraram mais tempo a infetar os macrófagos (P388D1), apontando possíveis diferenças nos mecanismos de reconhecimento indutores da fagocitose. Após 48 h de infecção, foi possível ilustrar o processo de fagocitose de *L. guyanensis* até à completa internalização do parasita.

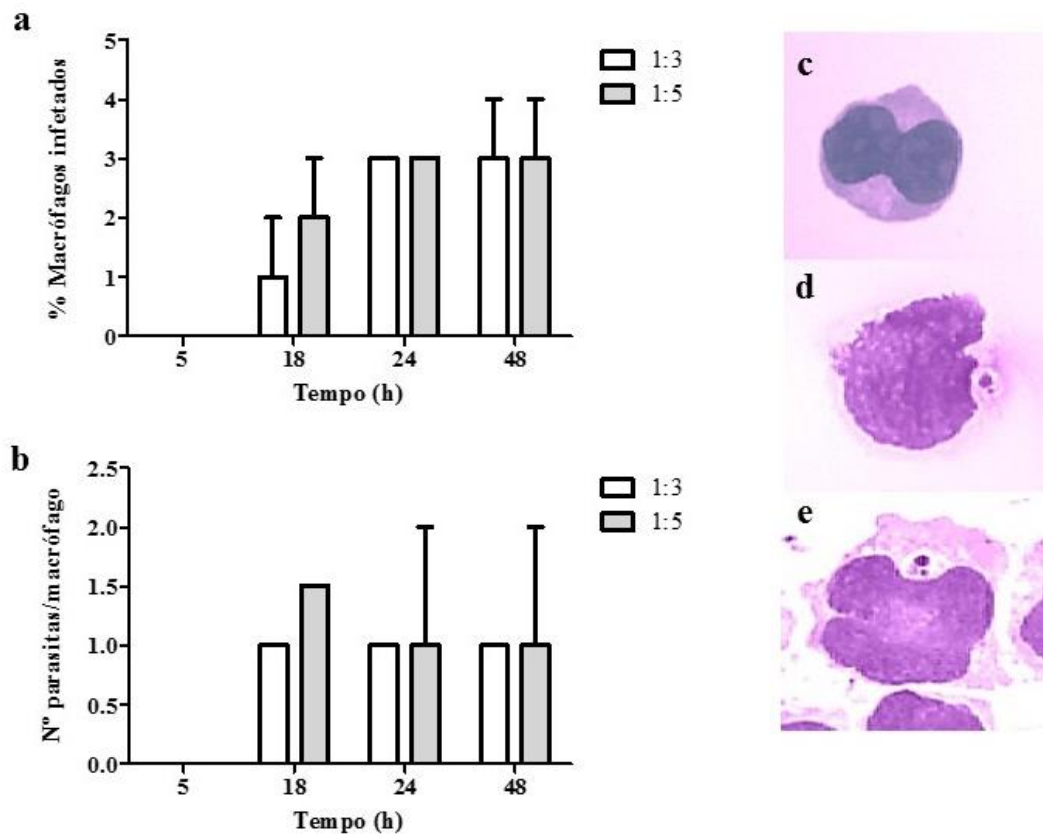


Figura 26: Infecção de macrófagos por promastigotas de *L. guyanensis*. A percentagem de macrófagos infetados e o número médio de amastigotas intracelulares por cada macrófago foi determinado às 5, 18, 24 e 48 h por observação ao microscópio ótico de lâminas de *cytospin* coradas com Giemsa. Foram utilizadas as proporções iniciais de infecção de 1:3 e 1:5 macrófago:parasita. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de três experiências independentes. Imagens de macrófagos infetados obtidas por microscopia ótica (1000×) são apresentadas a título exemplificativo: c- 1:3, 5 h; d- 1:3, 48 h; e- 1:5, 48 h.

Os parasitas, na forma promastigota e amastigota, na proximidade da membrana celular do macrófago induziram a diferenciação de pseudópodes (Fig. 27a).

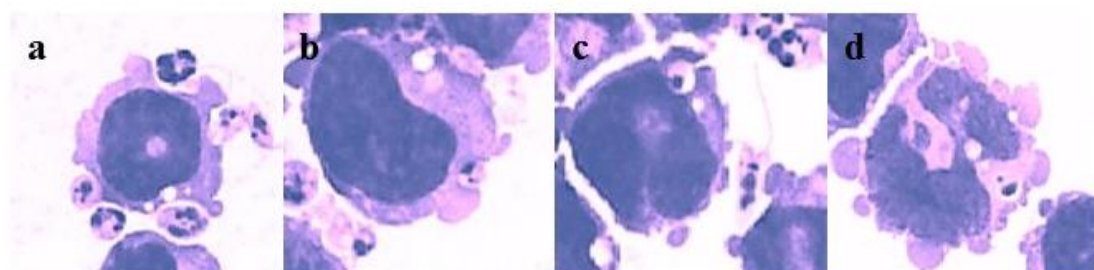


Figura 27: Fagocitose de *L. guyanensis* por macrófagos P388D1. A indução do processo fagocítico por promastigotas e amastigotas (a), o envolvimento progressivo do parasita (b, c) e a sua completa internalização (d) foi observado em lâminas de *cytospin* coradas com Giemsa ao microscópio ótico, com ampliação de 1000×.

Os pseudópodes foram aumentando, envolvendo por completo o parasita (Fig. 27b, c), ficando o amastigota localizado no interior da célula (Fig. 27d).

5.2. Efeito da associação de EPI com fármacos clássicos e novos compostos na infecção por *Leishmania* spp.

O efeito da associação de EPI com fármacos clássicos e novos compostos em macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. foi analisado. A percentagem mínima de macrófagos infetados após 72 h de tratamento com EPI (CC₁₀ ou IC₁₀), com fármacos clássicos ou novos compostos (CC₁₀) ou com fármacos clássicos ou novos compostos em associação com EPI foi determinada por LDA. Macrófagos infetados não tratados foram usados como controlo. Em paralelo, foi também considerado como critério de incremento da atividade antileishmania do fármaco ou novo composto induzido pela presença dos EPI, a diminuição de duas diluições na LDA (parasitas viáveis).

5.2.1. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ)

Macrófagos infetados com *L. infantum* não tratados e tratados com os diferentes EPI (VER, ORT e PABN) mantiveram-se infetados (~100%) (Fig. 28), demonstrando que *in vitro* VER, ORT e PABN isoladamente não têm qualquer efeito na redução do parasitismo.

O tratamento com a miltefosina causou, como seria de esperar, redução significativa (índice de redução das células parasitadas, IR≈84,96%) de células infetadas ($p<0,001$) quando comparados com células não tratadas. A associação da miltefosina com VER (IR≈92,16%, $p<0,001$, Fig. 28a), ORT (IR≈90%, $p<0,001$, Fig. 28b) ou PABN (IR≈95,28, $p<0,001$, Fig. 28c) causou também reduções significativas em comparação com células não tratadas.

Nos casos das células tratadas com miltefosina em associação com os EPI foi verificado que as diluições positivas da LDA não indicam diferenças em comparação com as células tratadas unicamente com miltefosina, confirmando as estimativas anteriores. A análise da natureza das interações da miltefosina com VER, ORT ou PABN indicaram existir sinergia (Σ FPI = 0,6, 0,76 e 0,36, respetivamente) entre o fármaco e o inibidor.

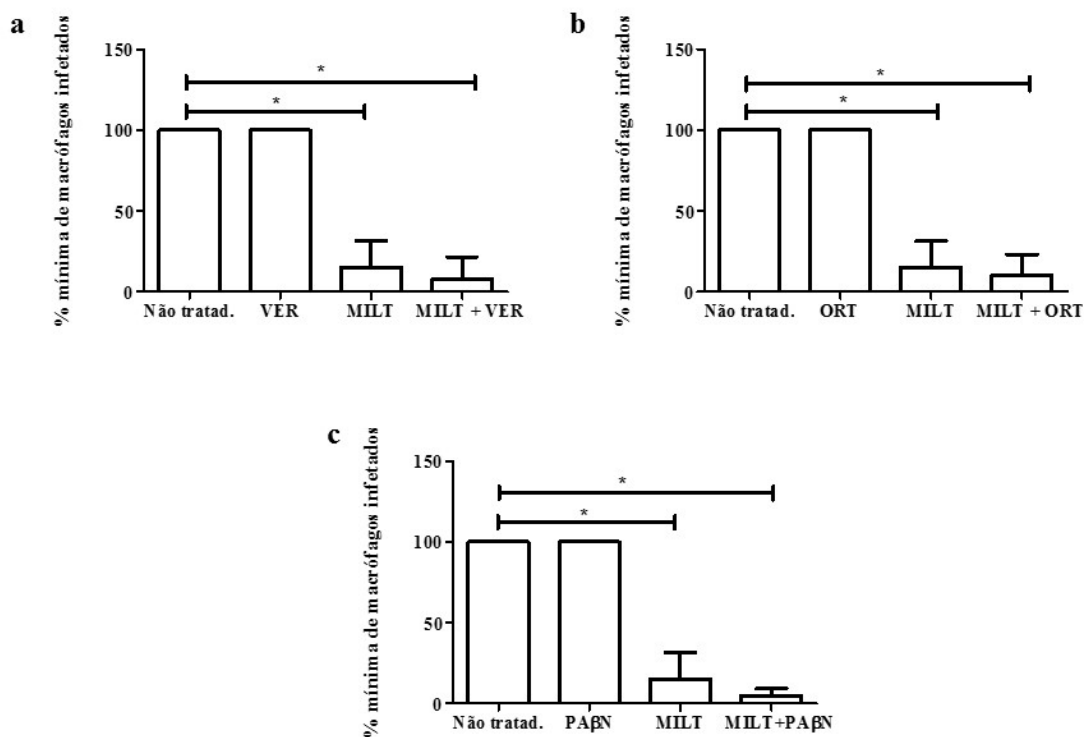


Figura 28: Efeito da associação de EPI com a miltefosina na infecção por *L. infantum*. O nível da infecção, após tratamento de macrófagos infectados com miltefosina (MILT) em associação com VER (a), ORT (b) ou PABN (c) foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados e tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

Macrófagos infectados e tratados com CH8 apresentaram redução acentuada da infecção ($IR \approx 100\%$, $p < 0,001$) quando comparados com as células não tratadas. A associação de EPI com CH8 não induziu qualquer alteração. Nos casos das células tratadas com CH8 em associação com os EPI, as diluições positivas da LDA não indicam diferenças em comparação com as células tratadas unicamente com CH8, confirmando as estimativas anteriores.

Macrófagos infectados tratados com quercetina ou ácido ursólico ou tratados com quercetina ou ácido ursólico em associação com EPI não sofreram redução da infecção ($IR \approx 0$). De igual modo, a análise das diluições positivas da LDA não indicam diferenças em comparação com as células não tratadas, confirmando as estimativas.

5.2.2. Sub-género *Leishmania* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Macrófagos infectados com a estirpe HOM de *L. amazonensis* não tratados e tratados com VER, ORT ou PABN apresentaram ~100% de infecção (Fig. 29). O tratamento com miltefosina e com miltefosina em conjugação com VER (Fig. 29a) causou diminuição de macrófagos infectados (IR≈37,2% e IR≈41,04%, respetivamente).

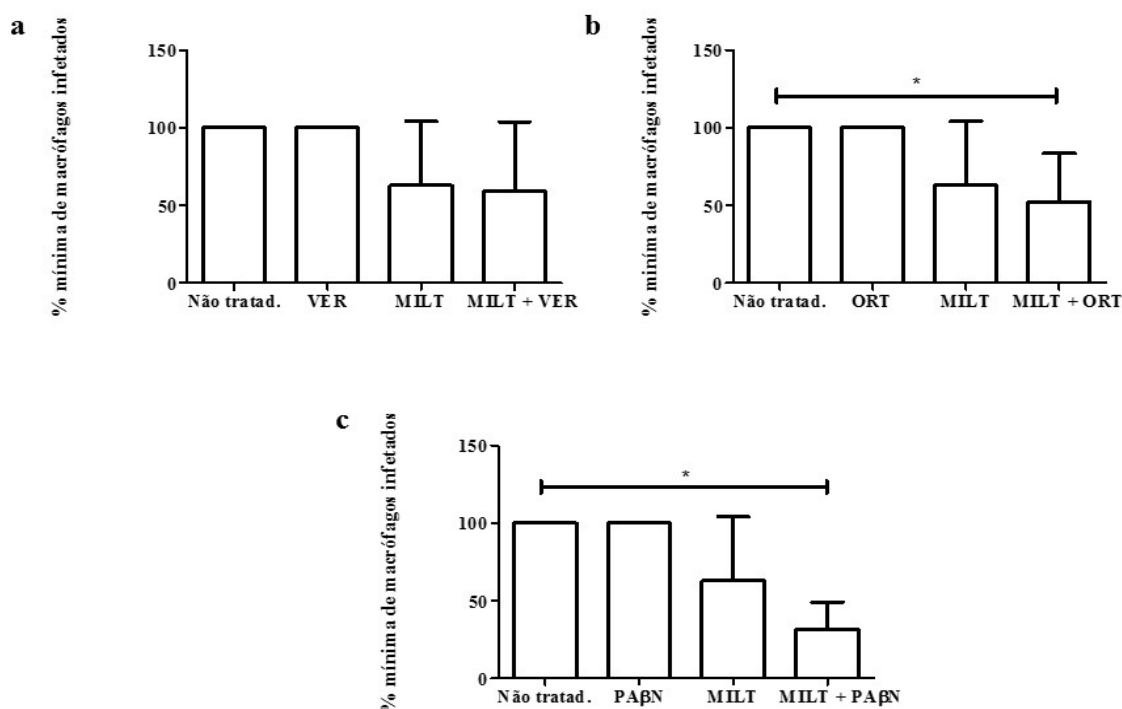


Figura 29: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infecção com a estirpe HOM de *L. amazonensis*. Após tratamento de macrófagos infectados com miltefosina (MILT) em associação com VER (a), ORT (b) ou PABN (c), o nível da infecção foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

O tratamento com miltefosina em associação com ORT (IR≈48,12%, $p=0,010$, Fig. 29b) apresentou redução significativa quando comparado com macrófagos não tratados. Porém, os valores máximos de inibição do parasitismo foram obtidos quando a associação miltefosina-PABN (IR≈68,64%, $p < 0,001$, Fig. 29c) foi utilizada. Nos casos das células tratadas com miltefosina em associação com os EPI, as diluições positivas da LDA não indicaram diferenças em comparação com as células tratadas unicamente com miltefosina, confirmando as estimativas anteriores. A análise da natureza das interações da miltefosina com VER ou ORT foram indiferentes ($\Sigma FPI=1,528$ e $1,345$,

respetivamente) enquanto que com PA β N indicaram sinergia (Σ FPI = 0,813) entre o fármaco e o inibidor.

Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (HOM) e tratados com CH8 ou com CH8 em associação com VER, ORT ou PABN apresentaram percentagem mínima de infecção (IR \approx 100%, $p < 0,001$) quando comparados com células não tratadas. Pelo contrário, macrófagos tratados com quercetina, ácido ursólico ou com quercetina ou ácido ursólico em associação com EPI, apresentaram uma percentagem máxima de infecção (IR \approx 0%). As diluições positivas da LDA também não indicam diferenças em comparação com as células tratadas unicamente com CH8, confirmando as estimativas anteriores.

Macrófagos infectados tratados com quercetina ou ácido ursólico ou tratados com quercetina ou ácido ursólico em associação com EPI não sofreram redução da infecção (IR \approx 0). De igual modo, a análise das diluições positivas da LDA não indicam diferenças em comparação com as células não tratadas, confirmando as estimativas.

5.2.3. Sub-género *Viannia* - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Macrófagos infectados com *L. shawi* não tratados revelaram percentagem de infecção \sim 100% (Fig. 30). O tratamento com EPI (IR_{VER} ou ORT \approx 14,76%) (Fig. 30a, b) causou diminuição do nível de infecção que no caso do PA β N atingiu valores significativos (IR \approx 96,96%, $p < 0,001$, Fig. 30c) quando comparado com células infectadas não tratadas. Resultados idênticos são observados quando o critério utilizado é o título da última diluição da LDA.

Macrófagos tratados com miltefosina apresentaram redução significativa dos níveis de infecção (IR=99,95%, $p < 0,001$) quando comparada com macrófagos não tratados. Células tratadas com miltefosina em conjugação com VER (IR \approx 99,94%, $p < 0,001$, Fig. 30a), ORT (IR \approx 94,68%, $p < 0,001$, Fig. 30b) ou PA β N (IR \approx 99,97%, $p < 0,001$, Fig. 30c) apresentaram acentuada redução da infecção quando comparadas com células não tratados. Apesar destas diferenças, macrófagos tratados com miltefosina em associação com VER ou ORT mostraram aumento da infecção que atingiu valores significativos no caso do ORT ($p < 0,001$) em comparação com células tratadas unicamente com miltefosina. De igual modo, pela análise das diluições positivas da LDA

III. Resultados

foi observado diferença de pelo menos duas diluições quando são comparadas células tratadas com miltefosina com células tratadas com miltefosina e ORT.

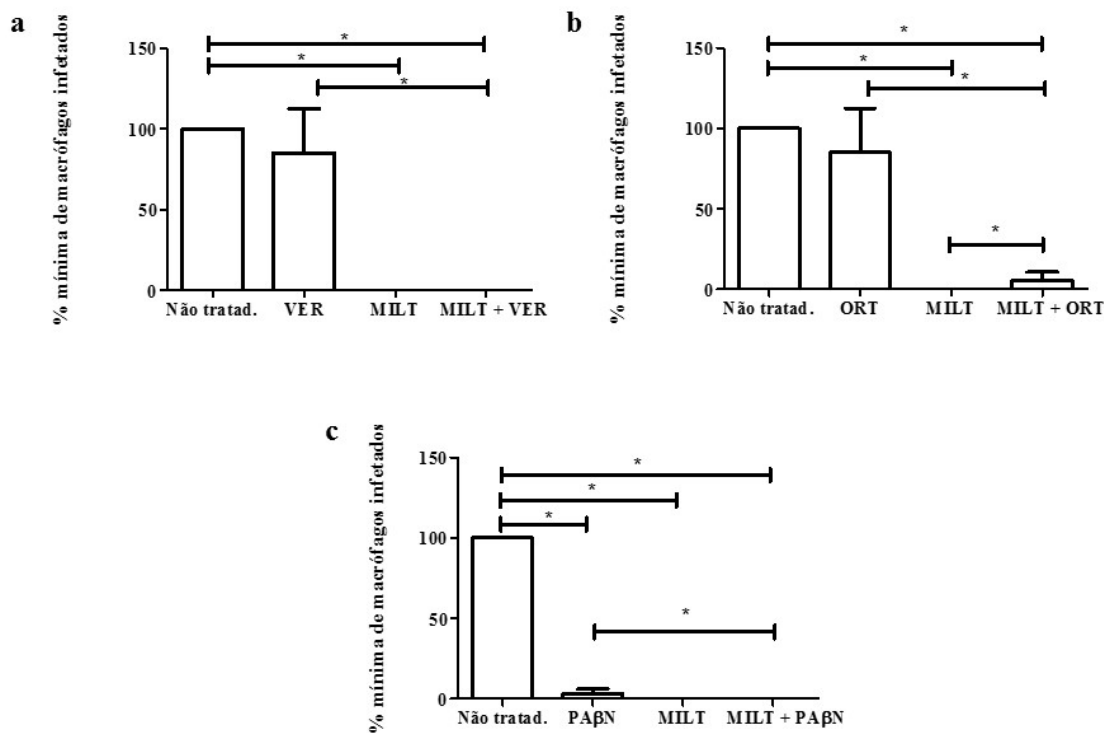


Figura 30: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infecção por *L. shawi*. Após tratamento de macrófagos infectados com miltefosina (MILT) em associação com VER (a), ORT (b) ou PAβN (c), o nível da infecção foi estimado pelo método de diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

O tratamento com miltefosina em associação com VER, ORT ou PAβN apresentaram reduções significativas quando comparados com células tratadas unicamente com cada um dos EPI ($p_{VER, ORT \text{ ou } PA\beta N} < 0,001$). A análise da natureza das interações de VER ou PAβN com miltefosina apontam para indiferença ($\Sigma FPI=1,07$) e sinergia ($\Sigma FPI=0,625$) respetivamente e enquanto que o ORT e miltefosina parecem ter ação antagónica ($\Sigma FPI=96,79$).

Macrófagos infectados por *L.shawi* tratados com CH8 e CH8 em associação com VER, ORT ou PABN apresentaram níveis mínimos de infecção ($IR \approx 100\%$, $p < 0,001$)

quando comparados com células não tratadas. A análise das diluições de LDA para aquelas condições confirmam as estimativas anteriores.

Macrófagos infectados tratados com quercetina apresentaram acentuada redução do nível de infecção (IR \approx 89,76%). A associação com VER (IR \approx 90,72%, Fig. 31a) ou PA β N (IR \approx 92,16%, Fig. 31c) manteve reduzidos os níveis de infecção.

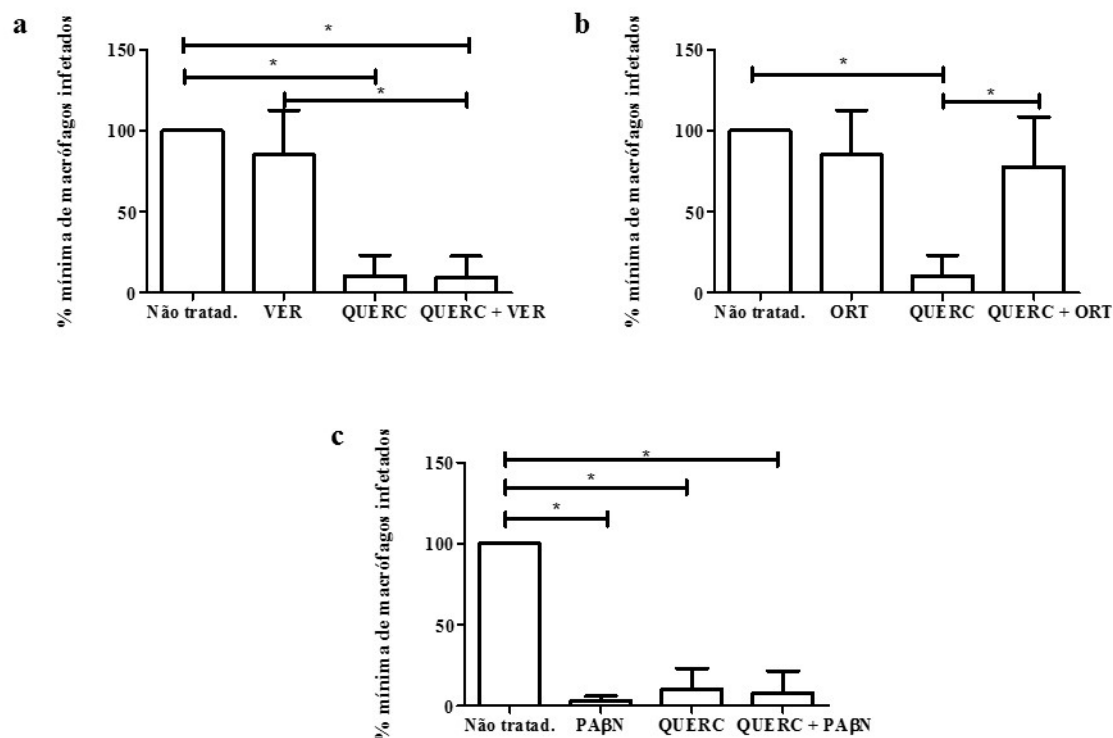


Figura 31: Efeito da associação de EPI com quercetina na infecção por *L. shawi*. Após tratamento de macrófagos infectados com quercetina (QUERC) em associação com VER (a), ORT (b) ou PA β N (c) o nível da infecção foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

Ambos os casos apresentam diferenças significativas ($p < 0,001$) quando comparados com células não tratadas. Células infectadas tratadas com quercetina apresentam redução significativa ($p < 0,001$) quando comparadas com células infectadas tratadas unicamente com o VER. Por sua vez, macrófagos tratados com quercetina e ORT apresentaram aumento significativo de infecção ($p < 0,001$) quando comparado com células tratadas com quercetina (Fig. 31b). A associação da quercetina com VER ou PA β N não

III. Resultados

eliminou o parasita por completo e com ORT até se verificou a reversão do efeito da quercetina. Resultados idênticos foram obtidos quando foram consideradas unicamente as diluições de LDA. Relativamente à natureza das interações, não se verificou qualquer relação do VER ou PAβN com a quercetina ($\Sigma FPI=1,02$ e $\Sigma FPI=3,34$), enquanto ORT e a quercetina apresentaram efeitos antagônicos ($\Sigma FPI =8,52$).

Macrófagos infetados e tratados com ácido ursólico revelaram redução significativa da infecção ($IR \approx 65,4\%$, $p=0,001$) quando comparado com macrófagos infetados e não tratados (Fig. 32).

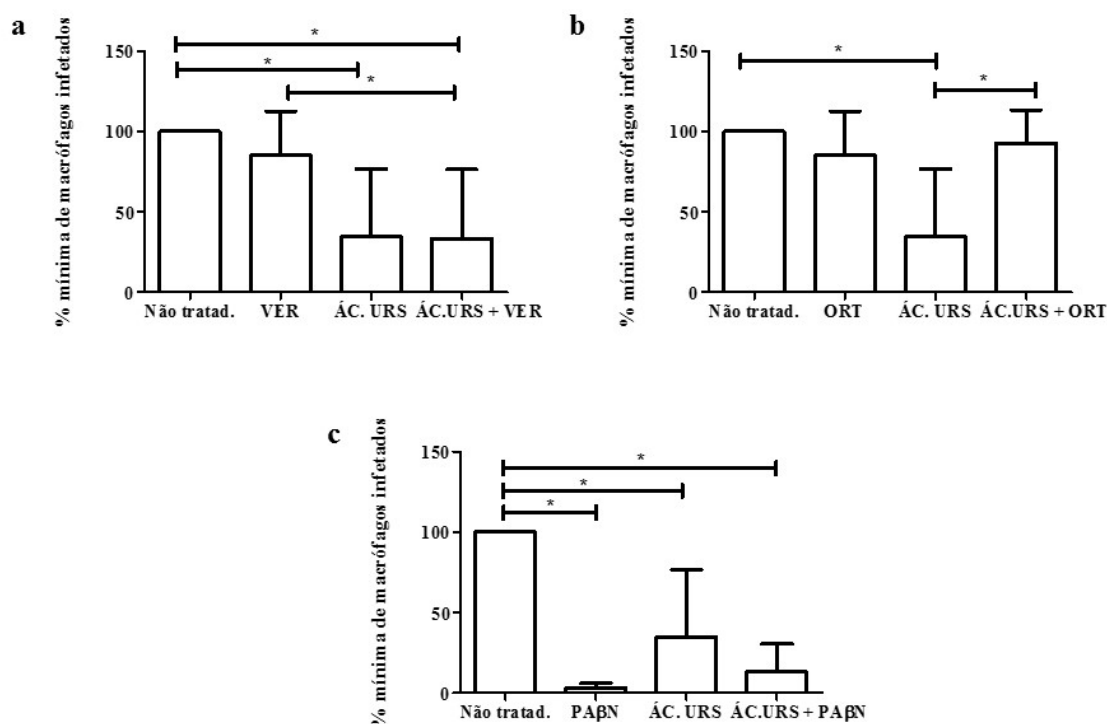


Figura 32: Efeito da associação de EPI com ácido ursólico na infecção por *L. shawi*. Após tratamento de macrófagos infetados com ácido ursólico (ÁC. URS) em associação com VER (a), ORT (b) ou PAβN (c) o nível da infecção foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infetados não tratados e macrófagos infetados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

A associação do ácido ursólico com o VER ($IR \approx 66,6\%$, $p = 0,001$, Fig. 32a) ou com o PAβN ($IR \approx 87,12\%$, $p < 0,001$, Fig. 32c) acentuou a redução do parasitismo. Contrariamente, a associação com ORT ($IR \approx 7,38\%$, Fig. 32b) conduziu ao aumento significativo da infecção ($p=0,015$) quando comparado com o tratamento com ácido

ursólico (Fig. 32b). A percentagem de infeção de células tratadas com ácido ursólico em associação com VER foi significativamente menor quando comparado com células tratadas unicamente com VER ($p=0,028$). Quando se utiliza como critério as diluições da LDA, apenas a associação ácido ursólico e PAβN apresentaram pelo menos dois títulos de diferença quando comparados com macrófagos não tratados. A natureza das interações do ácido ursólico com VER ou ORT foram indiferentes ($\sum FPI=1,93$ e $\sum FPI=3,76$, respetivamente) e com PAβN estabeleceu interação antagónica ($\sum FPI =4,61$).

Macrófagos infetados com *L. guyanensis* tratados com miltefosina apresentaram redução dos níveis de infeção (IR \approx 37,2%) quando comparados com macrófagos infetados e não tratados (Fig. 33).

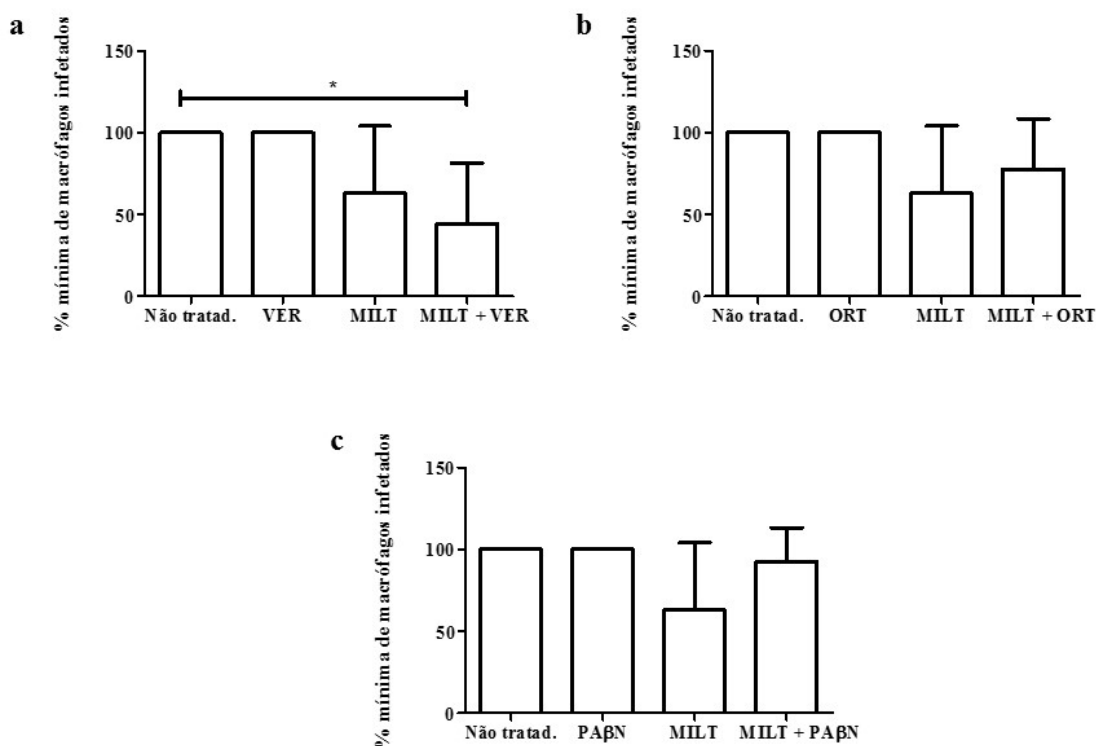


Figura 33: Efeito da associação de EPI com miltefosina na infeção por *L. guyanensis*. Após tratamento de macrófagos infetados com miltefosina (MILT) em associação com VER (a), ORT (b) ou PAβN (c), o nível da infeção foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infeção. Macrófagos infetados não tratados e macrófagos infetados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p < 0,05$) indica diferenças significativas em parasitas tratados quando comparados com parasitas não tratados.

III. Resultados

Porém, apenas a associação com VER teve efeitos significativos na redução da infecção (IR \approx 55,8%, $p=0,010$, Fig. 33a) quando comparados com macrófagos infectados e não tratados. Quando foram consideradas as diluições de LDA não se verificaram alterações importantes. A natureza das interações da miltefosina com VER (Σ FPI=1,15), ORT (Σ FPI=2,02) e PA β N (Σ FPI=2,40) foram indiferentes.

A redução do nível de infecção (IR) em macrófagos infectados com *L. guyanensis* tratados com CH8 foi aproximadamente de 99,75% (Fig. 34).

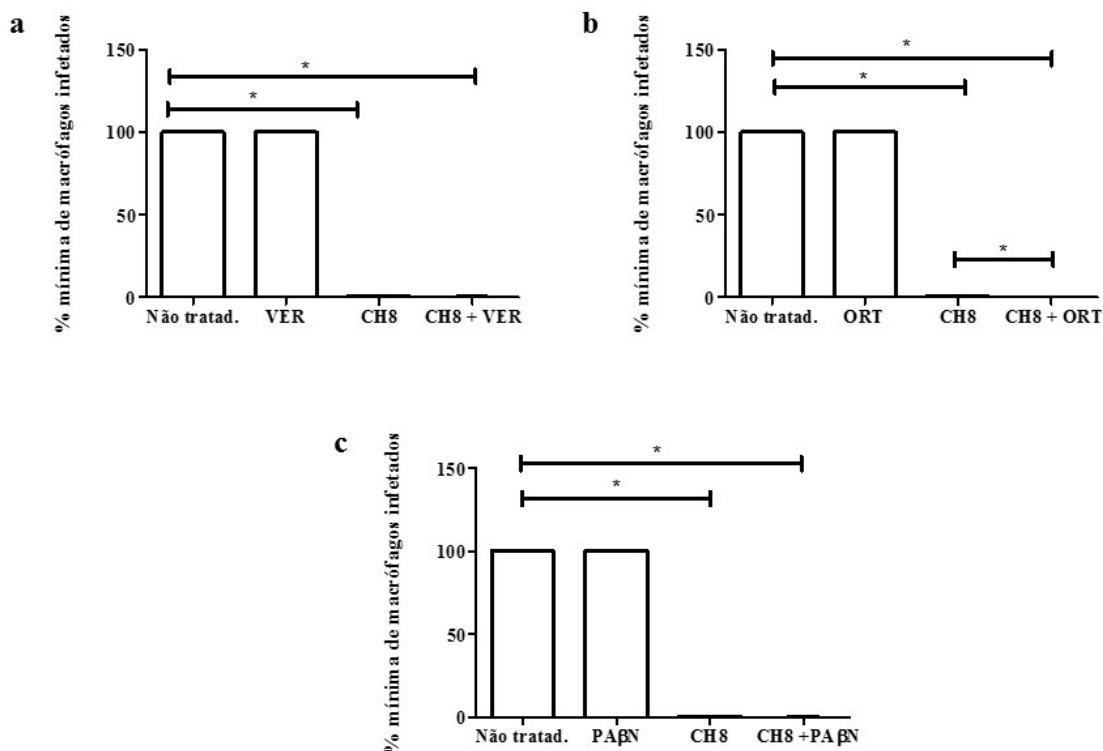


Figura 34: Efeito da associação de EPI com CH8 na infecção por *L. guyanensis*. Após tratamento de macrófagos infectados com chalcona (CH8) em associação com VER (a), ORT (b) ou PA β N (c), o nível da infecção foi estimado por diluição limite (LDA). A maior diluição em que se verificou a presença de parasitas foi utilizada para estimar a percentagem de infecção. Macrófagos infectados não tratados e macrófagos infectados tratados com cada um dos EPI foram utilizados como controlo. Os resultados encontram-se expressos pela média e desvio padrão de duas experiências independentes e de, pelo menos, três réplicas por condição. * ($p<0,05$) indica diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento.

Esta redução foi significativa quando comparados com macrófagos infectados e não tratados ($p<0,001$). A associação com VER (IR \approx 99,89%, $p<0,001$, Fig.34a), ORT (IR \approx 99,96%, $p<0,001$, Fig.34b) e PA β N (IR \approx 99,92%, $p<0,001$, Fig.34c) quase conduziu à eliminação do parasita, sendo os níveis de infecção significativamente diferentes quando

comparados com células não tratadas. A associação da CH8 com ORT causou diminuição significativa nos níveis de células infectadas quando comparado com células tratadas unicamente com a CH8 ($p=0,005$). Porém, estes resultados não são confirmados quando o critério é a diferença de pelo menos duas diluições da LDA. A interação do CH8 com o VER ($\Sigma FPI=0,46$), ORT ($\Sigma FPI=0,15$) ou PA β N ($\Sigma FPI=0,31$) revelou existência de sinergia entre os compostos.

O tratamento de macrófagos infectados com *L. guyanensis* com quercetina e ácido ursólico em associação com os EPI (VER, ORT e PABN) não induziu diminuição dos níveis de infecção.

IV. Discussão e Conclusões

A leishmaniose é uma das doenças parasitárias com maior impacto no Mundo, uma vez que apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Um dos problemas associado ao controlo dos parasitas do género *Leishmania* é a emergente resistência dos parasitas aos fármacos usados clinicamente. Comprometida a eficácia dos fármacos clássicos, o desenvolvimento de novos compostos com atividade antileishmania e a terapêutica combinada parecem ser as melhores estratégias para o tratamento da leishmaniose.

São várias as estratégias envolvidas no desenvolvimento de resistências aos fármacos antiparasitários (Ouellette, 2001). Em parasitas do género *Leishmania*, a resistência aos fármacos clássicos tem sido associada a bombas de efluxo, em particular aos transportadores ABC (Ouellette *et al.*, 2001; Pérez-Victoria *et al.*, 2001; Araújo-Santos *et al.*, 2005; Sauvage *et al.*, 2009). Devido à sua elevada atividade de membrana e efluxo de substratos, estes transportadores são responsáveis pelos fenótipos MDR em mamíferos (Dean *et al.*, 2001; Jones & George, 2005).

No presente estudo foi aplicado um método que permite caracterizar o efluxo de compostos e avaliar a sua reversão por EPI em macrófagos murinos e parasitas do género *Leishmania*. A acumulação de EtBr (substrato de bombas de efluxo) medida intracelularmente através da fluorescência emitida, pelo termociclador Rotor-Gene 3000, permitiu avaliar o potencial de TZ, PZ, PMZ, VER, ORT e PAßN como inibidores de bombas de efluxo e possíveis moduladores do fenótipo de MDR.

Em macrófagos murinos TZ e PMZ atuaram como moduladores, diminuindo o efluxo de EtBr para o exterior das células. Esta modulação é indicativa de que estes EPI podem reverter o efluxo de substratos em macrófagos murinos, provavelmente através da inibição da atividade das bombas Pgp (Spengler *et al.*, 2014).

Dos inibidores capazes de reverter o fenótipo MDR em diversos tipos de células, modificando a atividade dos transportadores ABC, TZ foi o único EPI que alterou o transporte de EtBr em *L. infantum*, *L. shawi* e *L. guyanensis*. O mesmo não foi verificado em parasitas do subgénero *Leishmania* e que causam LTA. Enquanto o VER e a PMZ

apenas alteraram o efluxo de EtBr em promastigotas avirulentos de *L. infantum* e *L. amazonensis* (PH). Por outro lado, PZ inibiu o efluxo de substrato de *L. amazonensis* (PH) e o ORT de promastigotas avirulentos de *L. infantum*. Por fim, o PAβN foi o único EPI que induziu o aumento de acumulação intracelular de EtBr em todas as estipes e espécies analisadas. Segundo Viveiros *et al.*, (2008), o PAβN inibe uma proteína do tipo AcrAB em bactérias. Assim, pensa-se que tal como acontece em bactérias, os parasitas do género *Leishmania* possuam uma proteína do tipo AcrAB que efluxa um vasto leque de substratos.

O efeito dos EPI varia de espécie para espécie de *Leishmania*, assim como o nível de resistência a fármacos conferido pelos transportadores depende de cada espécie de *Leishmania* (Pérez-Victoria *et al.*, 2001). Este facto, reflete provavelmente diferentes formas de atuação dos transportadores assim como de outros fatores necessários ao efluxo de substratos através da membrana.

Silva *et al.*, (2004), verificaram que parasitas resistentes a EPI apresentavam alterações morfológicas que tinham como consequências modificações na diferenciação, infecciosidade e sobrevivência do parasita. No presente estudo, os promastigotas avirulentos de *L. infantum* revelaram-se mais permissivos à modulação de bombas de efluxo do que os promastigotas virulentos. Similarmente, a estirpe mais virulenta (isto é com menor tempo de cultura) de *L. amazonensis* (HOM) também evidenciou maior resistência à modulação dos transportadores por EPI, quando comparado com promastigotas menos virulentos (isto é com maior tempo de cultura) de *L. amazonensis* (PH). Estes resultados sugerem que a diferença de atividade dos EPI e a capacidade dos transportadores está relacionada com os níveis de virulência do parasita. Uma vez que, a virulência de parasitas *Leishmania* spp. diminui em cultura (Santos-Gomes & Abranches, 1996, Moreira *et al.*, 2012).

Leprohon *et al.*, (2006) demonstraram que a atividade dos transportadores varia consoante a forma morfológica do parasita. Em nenhum dos ensaios realizados no presente trabalho foi possível reverter/modular o transporte de EtBr por amastigotas axénicos. Esta situação decorre possivelmente pelo facto de os EPI utilizados serem

seletivos para a forma promastigota e/ou o meio ácido e rico em enzimas do fagolisossoma poder contrariar a atividade dos moduladores.

A utilização do método da resazurina em macrófagos e parasitas do género *Leishmania* já tinha sido descrito por outros autores (Hendrickx *et al.*, 2012; Vale-Costa *et al.*, 2012, Corral *et al.*, 2013; Kulshrestha *et al.*, 2013). A otimização foi realizada com base na viabilidade celular e parasitária, utilizando diferentes espécies de *Leishmania*, densidades celulares, tempos de incubação e avaliação da fluorescência emitida. A densidade celular adequada foi determinada com base na fluorescência obtida tendo em conta a duração do ciclo celular. De facto, densidades celulares menores necessitam de mais tempo para que a fluorescência gerada pela metabolização da resazurina seja detetável. Enquanto, concentrações superiores metabolizam a resazurina em pouco tempo, emitindo fluorescência superior ao limite de deteção do fluorímetro ou é perdida ao longo do tempo. Estando confirmada a existência de correlação entre a concentração celular e a capacidade de metabolização da resazurina durante um determinado período de tempo. Os parasitas multiplicam-se continuamente, diferindo substancialmente da divisão macrofágica. Neste caso específico foi necessário determinar as condições para se verificar a densidade parasitária suficiente para gerar sinal quantificável, garantindo em simultâneo que a divisão dos promastigotas não fosse limitada pelo esgotamento dos constituintes do meio de cultura.

Com o objetivo de minimizar quaisquer danos nas células do hospedeiro, os níveis de CC₁₀ correspondente a 90% de viabilidade dos macrófagos após exposição ao VER, ORT ou PABN foram selecionadas e utilizadas na caracterização da internalização de fármacos e compostos por células infetadas por *Leishmania* spp. Os derivados da fenotiazida, TZ, PZ e PMZ, mantêm a elevada toxicidade característica das fenotiazinas (Musuka *et al.*, 2013). Contrariamente, o PABN não apresenta toxicidade para a linha celular macrofágica.

De forma a garantir que o uso dos EPI potencia a atividade dos fármacos antileishmania e de novos compostos, não tendo por si só efeitos inibitórios na replicação parasitária, selecionou-se os EPI utilizando as concentrações mais baixas correspondentes ao CC₁₀ (macrófagos) e o IC₁₀ (parasitas) nos estudos de caracterização da internalização de fármacos e compostos em células infetadas por *Leishmania* spp.

Dos EPI analisados, VER, PZ, PMZ e ORT apresentaram menor toxicidade para a espécie *L. infantum*. Contrariamente, TZ e PAβN evidenciaram elevada atividade antileishmania. Em parasitas do gênero *Leishmania* que causam LC, VER, PZ, ORT e PAβN revelaram baixa toxicidade. Porém, TZ e PMZ demonstraram possuir atividade anti *L. amazonensis*. Nos parasitas do subgênero *Viannia* a citotoxicidade de VER, PZ, PMZ, ORT e PAβN foi reduzida, no entanto TZ mostrou possuir elevada atividade antiparasitária. Resumidamente, TZ é o EPI com maior atividade antileishmania, contrariamente ao VER em LVZ e PAβN em LTA. Os EPI são moduladores das proteínas associadas a diversos transportadores celulares. Estas moléculas desempenham funções essenciais para a manutenção da homeostasia celular. Neste estudo, verificou-se que praticamente todos os EPI possuem atividade leishmanicida, uma vez que ao regularem as bombas de efluxo alteram o transporte de metabolitos, colocando em risco funções essenciais à viabilidade celular.

Em promastigotas virulentos de *L. infantum*, o IC₅₀ dos EPI é superior quando comparado com promastigotas avirulentos, assim como a estirpe HOM de *L. amazonensis* apresenta IC₅₀ dos EPI superior quando comparada com promastigotas da estirpe PH, exceto para o ORT e PAβN. Estes resultados indicam que parasitas mais virulentos são mais resistentes aos EPI que alteram a atividade das ATPases. Por outro lado, as espécies que causam LC são mais sensíveis aos EPI do que os promastigotas virulentos de *L. infantum*, com exceção do ORT e PAβN. A suscetibilidade dos EPI aparenta estar relacionada com as formas clínicas e atividade das ATPases. Em promastigotas de *L. shawi*, o IC₅₀ dos EPI foram superiores aos encontrados para *L. guyanensis*, com exceção do VER, ORT e PABN. Estes EPI evidenciaram maior seletividade para os parasitas do subgênero *Leishmania*, tendo apresentado menor citotoxicidade quando comparados com os restantes EPI.

O potencial antileishmania dos novos compostos, ácido ursólico, ácido oleanólico, CH8 e quercetina, já tinha sido anteriormente descrita por outros autores. Com o intuito de reduzir danos celulares, nos ensaios de internalização de fármacos e novos compostos por macrófagos parasitados foram utilizadas as concentrações de CC₁₀ previamente determinadas para os diferentes fármacos e compostos. Foi verificado que o ácido ursólico e a associação ácido oleanólico e ursólico apresentavam maior citotoxicidade. A

toxicidade dos ácidos ursólico e oleanólico e da quercetina já havia sido verificada por Gnoatto *et al.* (2008) e Mari *et al.* (2009), Montrieux *et al.* (2014), respetivamente. De facto, estes compostos apresentaram maior toxicidade na linha celular P388D1 do que o fármaco de referência miltefosina. Enquanto que o antimoniato de meglumina e a CH8 apresentaram citotoxicidade reduzida quando comparados com os restantes compostos. Os níveis de citotoxicidade da CH8 verificados no presente estudo estão de acordo com os referidos por Hermoso *et al.* (2003) e Mello *et al.* (2014), sendo menos tóxica do que outras chalconas (Mello *et al.*, 2014).

Após análise dos valores de IC₅₀ dos diferentes fármacos e compostos obtidos em promastigotas, a miltefosina, o ácido ursólico, a CH8 e a quercetina foram selecionados para os ensaios de caracterização da internalização de fármacos por células infetadas por *Leishmania* spp. O antimoniato de meglumina não foi selecionado por não ter sido possível determinar o IC₅₀. No entanto, este resultado é bastante plausível, uma vez que atua como um pró-fármaco, precisando de ser reduzido à sua forma trivalente para se tornar ativo. De igual modo, tal como já havia sido verificado por Peixoto *et al.* (2011) a associação ácido ursólico e oleanólico foi excluída por não existirem diferenças importantes quando comparados com parasitas tratados unicamente com ácido ursólico.

Apesar de na literatura a atividade antileishmania dos novos compostos ser um tema controverso, os resultados obtidos no presente estudo indicam que consoante as espécies em causa os compostos têm atividade antileishmania elevada ou moderada. Em algumas das espécies de *Leishmania*, os compostos evidenciaram atividade leishmanicida superior à da miltefosina. O ácido ursólico e a CH8 parecem ser os compostos mais eficientes na eliminação dos parasitas causadores de LVZ. Segundo Passero *et al.*, (2011), as variações de resultados obtidas pelos diferentes grupos de investigadores para os mesmos compostos pode ser consequência da origem das estipes e do nível de virulência de cada espécie ou estirpe, uma vez que a virulência do parasita pode ser alterada durante o período em que foram mantidos em cultura axénica (*in vitro*) sem terem tido contacto com hospedeiro vertebrado ou invertebrado (Santos-Gomes & Abranches, 1996, Moreira *et al.*, 2012).

Os valores de IS obtidos indicam que a miltefosina e a CH8 têm maior seletividade para o parasita quando comparados com os restantes fármacos e compostos. Quando

comparada com a miltefosina, a CH8 é mais seletiva uma vez que não apresentou citotoxicidade na linha celular P388D1. Com já descrito por Musayeib *et al.* (2013) o ácido ursólico e a combinação ácido oleanólico e ursólico revelaram seletividade reduzida para *Leishmania* spp.

Os macrófagos são as células hospedeiras de parasitas do género *Leishmania*. As espécies do subgénero *Leishmania* foram mais infetantes para a linha celular P388D1. Principalmente, as que provocam LTA que no presente estudo atingiram as maiores taxas de infeção. Contrariamente, *L. infantum* e as espécies do subgénero *Viannia* atingiram baixos níveis de infeção. Para além disso, as espécies do subgénero *Viannia* demoraram mais tempo a infetar os macrófagos (P388D1). Estes resultados apontam possíveis diferenças nos mecanismos de reconhecimento dos parasitas indutores da fagocitose.

O efeito da associação de EPI com fármacos clássicos e novos compostos em macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. foi analisado. Isoladamente, os EPI VER, ORT e PABN não têm qualquer efeito na redução do parasitismo em macrófagos infetados *in vitro* com *L. infantum*, *L. amazonensis* (HOM) ou *L. guyanensis*. Contrariamente, ORT, VER e PABN reduziram os níveis de infeção de macrófagos por *L. shawi*. A redução mais significativa ocorreu com a utilização de PABN. Esta redução do parasitismo por EPI pode estar relacionada com o facto de as concentrações utilizadas terem sido definidas em promastigotas e não em amastigotas e por uma eventual afinidade ou capacidade de destruir os parasitas variável. Segundo Silva (2014) a forma do parasita faz variar a concentração necessária para inibir o crescimento de parasitas e os compostos podem ter maior afinidade por uma das formas morfológica dos parasitas. Apesar deste resultado, a redução da infeção é mais eficaz na presença da associação miltefosina-EPI (VER, ORT ou PABN), quercetina-VER e ácido ursólico-VER. A espécie *L. shawi* é a mais permissiva à atividade dos EPI isoladamente e, simultaneamente menos sensível à combinação de fármaco-EPI, sugerindo um possível mecanismo competitivo entre os compostos.

A miltefosina diminui o número de células infetadas por *L. shawi* ou por parasitas do subgénero *Leishmania* quer isoladamente ou em conjunto com VER, ORT ou PABN. Em macrófagos infetados com *L. guyanensis*, a miltefosina apenas reduziu a infeção

quando em associação com o VER. VER, ORT ou PA β N potenciaram a ação da miltefosina, estabelecendo relações de sinergia em células infetadas com *L. infantum*. Sendo que a maior atividade antileishmania ocorre com a associação miltefosina-PA β N. Esta última condição também se verifica em macrófagos infetados com a estirpe HOM de *L. amazonensis* e *L. shawi*. Os resultados sugerem que a miltefosina poderá ser um substrato de transportadores, em particular do tipo AcrAB existente em bactérias (Viveiros *et al.*, 2008). A maior atividade do fármaco em associação com o EPI, deve-se possivelmente à inibição dos transportadores e consequentemente à redução do efluxo.

Na infecção por *L. shawi*, o ORT estabelece relações de antagonismo com a miltefosina, apontando para a existência de competição entre os substratos, nomeadamente entre o fármaco antileishmania e o EPI. Sugerindo ainda que *L. shawi* tem maior secreção de fosfatases ácidas, essenciais na infecção, do que as outras espécies em estudo (Mendez *et al.*, 2014). Enquanto que em macrófagos infetados com *L. guyanensis*, nenhum dos EPI potenciou a atividade antiparasitária da miltefosina, sugerindo que a atividade dos transportadores não é constante em todas as espécies de *Leishmania*.

Em *L. shawi* e nas duas espécies do subgénero *Leishmania*, concentrações não tóxicas de CH8 eliminaram a infecção. Porém, CH8 isoladamente ou em associação com o VER, ORT ou PA β N apenas promoveu a redução dos níveis de infecção por *L. guyanensis*. Neste caso, os EPI potenciam a atividade de CH8, estabelecendo interações sinérgicas com o composto. A associação de CH8 e ORT é mais eficaz na diminuição da parasitémia do que a miltefosina isoladamente. Estes resultados, sugerem que CH8 poderá ser um substrato dos transportadores ABC, semelhante à Pgp (Spengler *et al.*, 2014) e a AcrAB (Viveiros *et al.*, 2008) em bactérias. Podendo a atividade de CH8 ser aumentada com a utilização de EPI não tóxicos, nomeadamente fitoquímicos que diminuam o seu efluxo para fora da célula.

Nas condições do presente estudo, a quercetina, isoladamente ou em associação com o VER ou com o PA β N reduziu o número de células infetadas por *L. shawi*. A associação como os EPI não incrementou a atividade terapêutica da quercetina. Como a quercetina é também um EPI (Roohparvar *et al.*, 2007) pode atuar nos mesmos transportadores que os outros EPI, estabelecendo uma possível relação de competitividade, não tendo assim potenciada a sua atividade. Em macrófagos infetados

com *L. shawi* o VER e o ORT também não potenciam a ação da miltefosina, sendo que este último estabelece relações de antagonismo entre os compostos. Estes resultados sugerem que os transportadores de *L. shawi* poderão ter atividades e modulação diferentes das outras espécies. Sugerindo que as várias espécies podem ter afinidades diferentes para o mesmo substrato.

O ácido ursólico, isoladamente ou em associação com o VER ou com o PAβN, unicamente reduz a infecção de macrófagos por *L. shawi*. O que sugere que *L. shawi* é mais permissiva ao tratamento com ácido ursólico do que as outras espécies em estudo. VER, ORT PAβN não potenciam a atividade do ácido ursólico, sendo antagonísticos. Este fenómeno ocorre possivelmente por um mecanismo de competição e por o EPI poder induzir o efluxo do composto por outros transportadores (Biot *et al.*, 2013)

Resumindo, os novos compostos têm maior atividade em amastigotas do subgénero *Viannia*. No entanto, a modulação dos transportadores responsáveis pelo efluxo dos fármacos varia entre as espécies de *Leishmania*. O PAβN modifica a atividade de transportadores que efluxam substratos, nomeadamente transportadores do tipo AcrAB existente em bactérias (Liu *et al.*, 2010 , Voukeng *et al.*, 2012) e potencia o efeito da terapêutica na maioria dos parasitas do género *Leishmania*. Por sua vez, o VER, um inibidor da atividade de Pgp, estabelece relações de sinergia com os compostos provavelmente através da modulação de Pgp (Kaur & Dey, 2000). O funcionamento normal do ORT, pode ser alterado por outros compostos como a quercetina (Leslie *et al.*, 2001). Para além disso, apresenta atividade variável consoante a espécie de *Leishmania* que infeta os macrófagos. Esta variação de atividade deve-se possivelmente, à forma como inibe as ATPases em cada espécie de *Leishmania*, tendo implicações na geração da energia necessária ao funcionamento das bombas (Spillman *et al.*, 2013).

Resultados diferentes, e em alguns casos mais favoráveis ao controlo da infecção por *Leishmania*, poderiam ter sido obtidos se fossem utilizadas concentrações de EPI superiores, que não fossem tóxicas apenas para o macrófago. No entanto, ao utilizar concentrações não tóxicas para o parasita, garantimos que o aumento da atividade dos fármacos se deve à modulação das bombas de efluxo e não à eventual atividade antileishmania dos EPI.

Conclusões e perspectivas futuras

O conjunto de trabalhos que compõem esta dissertação teve como objectivo caracterizar a internalização de fármacos clássicos com actividade antileishmania e de novos compostos por macrófagos parasitados com *Leishmania* spp. A utilização de EPI favorece a actividade antileishmania de compostos que são substratos das bombas de efluxo. O método utilizado permitiu avaliar um largo espectro de EPI em parasitas do género *Leishmania*. Apesar de esta avaliação ter sido realizada em promastigotas forneceu informações essenciais sobre o tipo de transportadores de efluxo associados a determinados fármacos, que deverão ser consideradas no estudo e avaliação de novas opções terapêuticas.

Os EPI revelaram-se uma opção válida para o desenho de uma terapêutica combinada antileishmania. Para além de potenciarem a actividade leishmanicida de fármacos clássicos e de novos compostos, em simultâneo, os EPI podem reduzir os efeitos tóxicos da terapêutica antileishmania e prevenir o aparecimento de resistências, facilitando o acesso do tratamento às populações mais desfavorecidas. É, portanto fundamental, continuar a investir no estudo de novos compostos antileishmania, de forma que num futuro próximo se disponha de um vasto leque de fármacos, e em EPI não tóxicos que possam ser utilizados em terapia combinada de modo a reduzir a concentração de fármacos necessários à cura das leishmanioses.

V. Referências Bibliográficas

- Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. 1998. Canine Leishmaniasis. New Concepts of Epidemiology and Immunopathology: Their Impact in the Control of Human Visceral Leishmaniasis. *Acta Médica Portuguesa* 11: 871–875.
- Al-Mutawakel K, Scutaru C, Shami A, Sakr M, Groneberg DS, Quarcoo D. 2010. Scientometric Analysis of the World-Wide Research Efforts Concerning Leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 3: 14.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Boer MD, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Horst RT, López-Vélez R, Moreno J. 2008. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: The Second 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews* 21: 334–359.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer MD. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PloS One* 7: e35671.
- Amaral L, Martins M, Viveiros M. 2007. Enhanced Killing of Intracellular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Compounds That Affect the Activity of Efflux Pumps. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1237–1246.
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. 1999. Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 361–398.
- Andrade HM, Toledo VPCP, Pinheiro MB, Guimarães TMPD, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandão RMSS, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML, Bartchewsky W, Monte SJH. 2011. Evaluation of Miltefosine for the Treatment of Dogs Naturally Infected with *L. infantum* (= *L. Chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology* 181: 83–90.

- Andrade-Neto VV, Matos-Guedes L, Rossi-bergmann B, Torres-Santos EC. 2012. The Stepwise Selection for Ketoconazole Resistance Induces Upregulation of C14-Demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 416–419.
- Andrighetti-Fröhner CR, Oliveira KN, Gaspar-Silva D, Pacheco LK, Joussef AC, Steindel M, Simões CMO, Souza AMT, Magalhães UO, Afonso IF, Rodrigues CR, Nunes RJ, Castro HC. 2009. Synthesis, Biological Evaluation and SAR of Sulfonamide 4-Methoxychalcone Derivatives with Potential Antileishmanial Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44: 755–763.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. 2012. Leishmaniasis: New Insights from an Old and Neglected Disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 109–118.
- Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Corvasce S, Colomba C, Titone L, Parravicini C, Cascio A, Corbellino M. 2007. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review. *Clinical Infectious Diseases* 44: 1602–1610.
- Araújo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. 2005. The Overexpression of an Intracellular ABCA-like Transporter Alters Phospholipid Trafficking in *Leishmania*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 349–55.
- Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, E Najar, Alvarez E, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A. 2001. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases* 33: 1847–1851.
- Ashford RW. 2000. The Leishmaniases as Emerging and Reemerging Zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30: 1269–1281.

-
- Ashutosh SS, Goyal N. 2007. Molecular Mechanisms of Antimony Resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology* 56: 143–153.
- Balaña-Fouce R, Alvarez-Velilla R, Fernández-Prada C, García-Estrada C, Reguera RM. 2014. Trypanosomatids Topoisomerase Re-Visited. New Structural Findings and Role in Drug Discovery. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4: 326–337.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology* 64: 1–109.
- Barrerao MAO, Pietralongaa PG, Schwarza DGG, Junior AS, Paula SO, Moreira MA. 2014. Effect of the Inhibitors Phenylalanine Arginyl SS-Naphthylamide (PABN) and 1-(1-Naphthylmethyl)-Piperazine (NMP) on Expression of Genes in Multidrug Efflux Systems of *Escherichia coli* Isolates from Bovine Mastiti. *Research in Veterinary Science* 97: 176–181.
- Basu JM, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, Tripathy G, Sinha PK, Pandey K, Sundar S, Bimal S, Das PK, Choudhuri SK, Roy S. 2008. Inhibition of ABC Transporters Abolishes Antimony Resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1080–1093.
- Begum S, Ayub A, Zehra SQ, Siddiqui BS, Choudhary MI, Samreen. 2014. Leishmanicidal Triterpenes from *Lantana camara*. *Chemistry & Biodiversity* 11: 709–718.
- Bello ML, Chiaradia LD, Dias LRS, Pacheco LK, Stumpf TR, Mascarello A, Steindel A, Yunes RA, Castro HR, Nunes RJ, Rodrigues CR. 2011. Trimethoxy-Chalcone Derivatives Inhibit Growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Modeling and Structure-Activity Relationship (SAR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 5046–5052.

- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1435–1439.
- Berman D. 1997. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clinical Infectious Diseases* 24: 684–703.
- Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, Boer MD, Davidson RN, Figueras C, Gradoni L, Kafetzis DA, Ritmeijer K, Rosenthal E, Royce C, Russo R, Sundar S, Alvar J. 2006. Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 43: 917–924.
- Bhandari V, Sundar S, Dujardin JD, Salotra S. 2014. Elucidation of Cellular Mechanisms Involved in Experimental Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 2580–2585.
- Biot FV, Lopez MM, Poyot T, Neulat-Ripoll F, Lignon S, Caclard A, Thibault FM, Peinnequin A, Pagès JM, Valade E. 2013. Interplay between Three RND Efflux Pumps in Doxycycline-Selected Strains of *Burkholderia thailandensis*. *PloS One* 8: e84068.
- Boeck P, Falcão CAB, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann AC. 2006. Synthesis of Chalcone Analogues with Increased Antileishmanial Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 1538–1545.
- Bogdan C, Röllinghoff M. 1998. The Immune Response to *Leishmania*: Mechanisms of Parasite Control and Evasion. *International Journal for Parasitology* 28: 121–134.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Solbach W. 1990. Evasion Strategies of *Leishmania* Parasites. *Parasitology Today* 6: 183–187.

- Borges-Argáez R, Balnbury L, Flowers A, Giménez-Turba A, Ruiz G, Waterman PG, Peña-Rodríguez LM. 2007. Cytotoxic and Antiprotozoal Activity of Flavonoids from *Lonchocarpus* spp. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 14: 530–533.
- BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK. 2008. A Novel ATP-Binding Cassette Transporter, ABCG6 Is Involved in Chemoresistance of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 158: 176–188.
- Bošnjak I, Bielen A, Babić S, Sver L, Popović NT, Strunjak-Perović I, Což-Rakovac R, Klobučar RS. 2014. First Evidence of the P-Glycoprotein Gene Expression and Multixenobiotic Resistance Modulation in Earthworm. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 65: 67–75.
- Brotherton MC, Bourassa S, Légaré D, Poirier GG, Droit A, Ouellette M. 2014. Quantitative Proteomic Analysis of Amphotericin B Resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4: 126–132.
- Bryceson A. 2001. A Policy for Leishmaniasis with Respect to the Prevention and Control of Drug Resistance. *Tropical Medicine & International Health* 6: 928–934.
- Callahan HL, Beverley SM. 1991. Heavy Metal Resistance: A New Role for P-Glycoproteins in *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 18427–18430.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft SL, Marley D, Kirby GC, Warhurst DC. 2002. Assessment of the Antiprotozoal Activity of *Galphimia glauca* and the Isolation of New Nor-Secofriedelanes and Nor-Friedelanes. *Journal of Natural Products* 65: 1457–1461.
- Campino L, Maia C. 2010. Epidemiology of Leishmaniasis in Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 23: 859–864.

- Campos-Neto A, Soong L, Cordova JL, Sant' Angelo D, Skeiky YAW, Ruddle NH, Reed SG, Janeway C, McMahon-Pratt D. 1995. Cloning and Expression of a *Leishmania donovani* Gene Instructed by a Peptide Isolated from Major Histocompatibility Complex Class II Molecules of Infected Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 182: 1423–1433.
- Campos-Salinas J, León-Guerrero D, González-Rey E, Delgado M, Castanys S, Pérez-Victoria JM, Gamarro F. 2013. ABCG2, a New ABC Transporter Implicated in Phosphatidylserine Exposure, Is Involved in the Infectivity and Pathogenicity of *Leishmania*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2179.
- Castanys-Muñoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S. 2007. A Novel ATP-Binding Cassette Transporter from *Leishmania* Is Involved in Transport of Phosphatidylcholine Analogues and Resistance to Alkyl-Phospholipids. *Molecular Microbiology* 64: 1141–1153.
- Castanys-Muñoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. 2008. Characterization of an ABCG-like Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* with a Role in Drug Resistance and Transbilayer Lipid Movement. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 3573–3579.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. 2007. Visceral Leishmaniasis: What Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control? *Nature Reviews. Microbiology* 5: 873–882.
- Chiquero M, Pérez-Victoria J, O`Valle F, González-Ros J, Moral R, Ferragut J, Castanys S, Gamarro F. 1998. Altered Drug Membrane Permeability in a Multidrug- Resistant *Leishmania tropica* Line. *Biochemical Pharmacology* 55: 131–139.
- Chou TC. 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* 70: 440–446.

- Chow LMC, Wong AKC, Ullman B, Wirth DF. 1993. Cloning and Functional Analysis of an Extrachromosomally Amplified Multidrug Resistance-like Gene in *Leishmania enriettii*. *Parasitology, Molecular and Biochemical* 60: 195–208.
- Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. 2003. Functional Genetic Identification of PRP1, an ABC Transporter Superfamily Member Conferring Pentamidine Resistance in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130: 83–90.
- Coelho AC, Boisvert S, Mukherjee A, Leprohon F, Corbeil J, Ouellette M. 2012. Multiple Mutations in Heterogeneous Miltefosine-Resistant *Leishmania major* Population as Determined by Whole Genome Sequencing. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1512.
- Coelho AC, Gentil LG, Silveira JF, Cotrim PC. 2008. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promastigotes Resistant to Pentamidine. *Experimental Parasitology* 120: 98–102.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. 2007. Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in *Leishmania* Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 3030–3032.
- Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC. 2006. Intracellular Location of the ABC Transporter PRP1 Related to Pentamidine Resistance in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 150: 378–383.
- Corral MJ, González E, Cuquerella M, Alunda JM. 2013. Improvement of 96-Well Microplate Assay for Estimation of Cell Growth and Inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. *Journal of Microbiological Methods* 94: 111–116.
- Costa JD, Soares R, Finkelstein LC, Côte-Real S, Meirelles MN, Porrozzi R. 2009. Fast high yield of pure *Leishmania (Leishmania) infantum* axenic amastigotes and their infectivity to mouse macrophages. *Parasitology Research* 105: 227-236.

V. Referências Bibliográficas

- Croft SL, Olliaro P. 2011. Leishmaniasis Chemotherapy--Challenges and Opportunities. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 1478–1483.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology. Reviews* 19: 111–126.
- Croft SL, Coombs GH. 2003. Leishmaniasis – Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs. *Trends in Parasitology* 19: 502–508.
- Dassa E, Bouige F. 2001. The ABC of ABCs: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms. *Research in Microbiology* 152: 211–229.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. 2003. Leishmaniasis: New Approaches to Disease Control. *BMJ* 326: 377–382.
- De Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardoní MVC, Silveira TGV. 2014. Leishmanicidal Activity of Synthetic Chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Experimental Parasitology* 136: 27–34.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research* 11: 1156–1566.
- Decuypere S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Müller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC, Coombs GH. 2012. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Natural *Leishmania* Populations Vary with Genetic Background. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1514.
- Desjeux P. 1996. Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. *Clinics in Dermatology* 14: 417–423.
- Dodge MA, Waller RF, Chow LMC, Zaman MM, Cotton LM, Mcconville MJ, Wirth DF. 2004. Localization and Activity of Multidrug Resistance Protein 1 in the Secretory Pathway of *Leishmania* Parasites. *Molecular Microbiology* 51: 1563–1575.

- Dostálová A, Volf P. 2012. *Leishmania* Development in Sand Flies: Parasite-Vector Interactions Overview. *Parasites & Vectors* 5: 1–12.
- Duclos S, Desjardins M. 2000. Subversion of a Young Phagosome: The Survival Strategies of Intracellular Pathogens. *Cellular Microbiology* 2: 365–377.
- Dujardin JC. 2005. Risk Factors in the Spread of Leishmaniases: Towards Integrated Monitoring? *Trends in Parasitology* 22: 4–6.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M. 2008. Spread of Vector-Borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1013–1018.
- Essodaïgui M, Frézard F, Moreira ES, Dagger F, Garnier-Suillerot A. 1999. Energy-Dependent Efflux from *Leishmania* Promastigotes of Substrates of the Mammalian Multidrug Resistance Pumps. *Molecular and Biochemical Parasitology* 100: 73–84.
- Fadili KL, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Légaré D, Ouellette M. 2005. Role of the ABC Transporter MRPA (PGPA) in Antimony Resistance in *Leishmania infantum* Axenic and Intracellular Amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1988–1993.
- Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, Faugère B, Dumon H. 1997. *In vitro* and *in vivo* Resistance of *Leishmania infantum* to Meglumine Antimoniate: A Study of 37 Strains Collected from Patients with Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 827–830.
- Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. 2011. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *PloS One* 6: e14666.
- Fraga J, Montalvo AM, Doncker S, Dujardin JC, Auwera GV. 2010. Phylogeny of *Leishmania* Species Based on the Heat-Shock Protein 70 Gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 238–245.

- Gamarro F, Chiquero MJ, Amador MV, Légaré D, Ouellette M, Castanys S. 1994. P-Glycoprotein Overexpression in Methotrexate-Resistant *Leishmania tropica*. *Biochemical Pharmacology* 47: 1939–1947.
- Gnoatto SCB, Vechia LD, Lencina CL, Dassonville-Klimpt A, Nascimento S, Mossalayi D, Guillon J, Gosmann G, Sonnet P. 2008. Synthesis and Preliminary Evaluation of New Ursolic and Oleanolic Acids Derivatives as Antileishmanial Agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 23: 604–610.
- Goyard S, Segawa H, Gordon J, Showalter M, Duncan R, Turco SJ, Beverley SM. 2003. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130: 31-42.
- Gontijo B. 2003. American Cutaneous Leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 71–80.
- Gueiros-Filho FJ, Viola JPB, Gomes FCA, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. 1995. *Leishmania amazonensis*: Multidrug Resistance in Vinblastine-Resistant Promastigotes Associated with Rhodamine 123 Efflux, DNA Amplification, and RNA Overexpression of a *Leishmania mdr1* Gene. *Experimental Parasitology* 81: 480–490.
- Gupta S, Shivahare R, Korthikunta V, Singh R, Gupta S, Tadigoppula N. 2014. Synthesis and Biological Evaluation of Chalcones as Potential Antileishmanial Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 81: 359–366.
- Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M. 2000. Amplification of the ABC Transporter Gene *PGPA* and Increased Trypanothione Levels in Potassium Antimonyl Tartrate (SbIII) Resistant *Leishmania tarentolae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 108: 131–135.
- Hatam GR, Riyad M, Bichichi M. 2005. Isoenzyme Characterization of Iranian *Leishmania* Isolates from Cutaneous Leishmaniasis. *Iran Journal of Science & Tecnology* 29: 65–70.

-
- Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. 1992. Multidrug Resistance in *Leishmania donovani* Is Conferred by Amplification of a Gene Homologous to the Mammalian *mdr1* Gene. *Molecular and Cellular Biology* 12: 2855–2865.
- Hendrickx S, Luz RAI, Bhandari V, Kuypers K, Shaw CD, Lonchamp J, Salotra P, Carter K, Sundar S, Rijal S, Dujardin JC, Cos P, Maes L. 2012. Experimental Induction of Paromomycin Resistance in Antimony-Resistant Strains of *L. donovani*: Outcome Dependent on *in Vitro* Selection Protocol. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1664.
- Hermoso A, Jiménez IA, Mamani ZA, Bazzocchi IL, Piñero JE, Ravelo AG, Valladares B. 2003. Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 3975–3980.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191–1199.
- Higgins CF. 1992. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67–113.
- Higgins CF, Gallagher MP, Mimmack ML, Pearce SR. 1988. A Family of Closely Related ATP-Binding Subunits from Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 8: 111–116.
- Jeddi F, Piarroux R, Mary C. 2011. Antimony Resistance in *Leishmania*, Focusing on Experimental Research. *Journal of Tropical Medicine* 2011: 1-15.
- Jones PM, George AM. 2005. Multidrug Resistance in Parasites: ABC Transporters, P-Glycoproteins and Molecular Modelling. *International Journal for Parasitology* 35: 555–566.

V. Referências Bibliográficas

- Kars MD, Işeri OD, Gunduz U, Molnar J. 2008. Reversal of Multidrug Resistance by Synthetic and Natural Compounds in Drug-Resistant MCF-7 Cell Lines. *Chemotherapy*. 54: 194–200.
- Katakura K, Fujise H, Takeda K, Kaneko O, Torii M, Suzuki M, Chang KP, Hashiguchi Y. 2004. Overexpression of LaMDR2, a Novel Multidrug Resistance ATP-Binding Cassette Transporter, Causes 5-Fluorouracil Resistance in *Leishmania amazonensis*. *FEBS Letters* 561: 207–212.
- Katakura K, Iwanami M, Ohtomo H, Fujise H, Hashiguchi Y. 1999. Structural and Functional Analysis of the *LaMDR1* Multidrug Resistance Gene in *Leishmania amazonensis*. 294: 289–294.
- Kaur J, Dey CS. 2000. Putative P-Glycoprotein Expression in Arsenite-Resistant *Leishmania donovani* down-Regulated by Verapamil. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271: 615–619.
- Killick-Kendrick R. 1990. Phlebotomine Vectors of the Leishmaniases: A Review. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 1–24.
- Killick-Kendrick R. 1999. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology* 17: 279–289.
- Kim DH, Chung HJ, Bleys J, Ghohestani RF. 2009. Is Paromomycin an Effective and Safe Treatment against Cutaneous Leishmaniasis? A Meta-Analysis of 14 Randomized Controlled Trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3: e381.
- Kulshrestha, A , Bhandari V, Mukhopadhyay R, Ramesh V, Sundar S, Maes L, Dujardin JC, Roy S, Salotra P. 2013. Validation of a Simple Resazurin-Based Promastigote Assay for the Routine Monitoring of Miltefosine Susceptibility in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitology Research* 112: 825–828.

- Lainson R, Shaw JJ. 1987. *Evolution, Classification and Geographical Distribution*. Edited by Lainson R. In: Peters W, Killick-Kendrick R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, London: 1-120.
- Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. 2003. EfrAB , an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3733–3738.
- Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. 2001. The *Leishmania* ATP-Binding Cassette Protein PGPA Is an Intracellular Metal-Thiol Transporter ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 26301–26307.
- Leprohon P, Légaré D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. 2006. Modulation of *Leishmania* ABC Protein Gene Expression through Life Stages and among Drug-Resistant Parasites. *Eukaryotic Cell* 5: 1713–1725.
- Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SPC. 2001. Modulation of Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) Transport and ATPase Activities by Interaction with Dietary Flavonoids. *Molecular Pharmacology* 59: 1171–1180.
- Li XZ, Nikaido H. 2009. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs* 69: 1555–1623.
- Liu Y, Yang L, Molin S. 2010. Synergistic Activities of an Efflux Pump Inhibitor and Iron Chelators against *Pseudomonas aeruginosa* Growth and Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 3960–3963.
- Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogusuku E, Pérez JE, Cáceres A, Davies CR. 1999. Natural Infections of *Leishmania peruviana* in Animals in the Peruvian Andes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 15–20.

- Locher KP. 2009. Structure and Mechanism of ATP-Binding Cassette Transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364: 239–245.
- Locksley RM, Heinzel FP, Fankhauser JE, Nelson CS, Sadick MD. 1988. Cutaneous Host Defense in Leishmaniasis: Interaction of Isolated Dermal Macrophages and Epidermal Langerhans Cells with the Insect-Stage Promastigote. *Infection and Immunity* 56: 336–342.
- Lomovskaya O, Watkins W. 2001. Efflux Pumps: Their Role in Antibacterial Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry* 14: 1699–1711.
- Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. 1998. Geographic Distribution and Clinical Description of Leishmaniasis Cases in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 312–317.
- Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R. 1994. Naturally Acquired Infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in Guinea-Pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology* 109: 135–138.
- Mandal G, Sarkar A, Saha P, Singh N, Sundar S, Chatterjee M. 2009. Functionality of Drug Efflux Pumps in Antimonial Resistant *Leishmania donovani* Field Isolates. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 46: 86–92.
- Manjolin LC, Reis MBG, Maquiaveli CC, Santos-Filho OA, Silva ER. 2013. Dietary Flavonoids Fisetin, Luteolin and Their Derived Compounds Inhibit Arginase, a Central Enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. *Food Chemistry* 141: 2253–2262.
- Manzano JI, García-Hernández R, Castanys S, Gamarro F. 2013. A New ABC Half-Transporter in *Leishmania major* Is Involved in Resistance to Antimony. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 3719–3730.

- Marín C, Boutaleb-Charki S, Díaz JG, Huertas O, Rosales MJ, Pérez-Cordon G, Guitierrez-Sánchez R, Sánchez-Moreno M. 2009. Antileishmaniasis Activity of Flavonoids from *Consolida oliveriana*. *Journal of Natural Products* 72: 1069-1074.
- Martinez S, Marr JJ. 1992. Allopurinol in the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine* 326: 741-744.
- Matlashewski G, Das VNR, Pandey K, Singh D, Das S, Ghosh GK, Pandey RN, Das P. 2013. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Bihar India: Comparison of the rK39 Rapid Diagnostic Test on Whole Blood versus Serum. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2233.
- Mendez RS, Dorsey BM, Mclauchlan CC, Beio M, Turner TL, Victoria H, Su A, Beynon W, Friesen JA, Jones MA. 2014. Vanadium Complexes Are *in vitro* Inhibitors of *Leishmania* Secreted Acid Phosphatases. *International Journal of Chemistry* 6: 35-49.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. 2001. Diversity and Phylogeny of Insect Trypanosomatids Based on Small Subunit rRNA Genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 161-169.
- Meshnick SR, Eaton JW. 1981. Leishmanial Superoxide Dismutase: A Possible Target for Chemotherapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102: 970-976.
- Mesquita JT, Tempone AG, Reimão JQ. 2013. Combination Therapy with Nitazoxanide and Amphotericin B, Glucantime(®), Miltefosine and Sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* Intracellular Amastigotes. *Acta Tropica* 130: 112-116.

- Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK. 2000. Luteolin , an Abundant Dietary Component Is a Potent Anti-Leishmanial Agent That Acts by Inducing Topoisomerase II-Mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis. *Molecular Medicine* 6: 527–541.
- Montrieux E, Perera WH, García M, Maes L, Cos P, Monzote L. 2014. *In vitro* and *in vivo* Activity of Major Constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research* 113: 2925–2932.
- Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, Ouaissi A, Cordeiro-da-Silva A, Silvestre R. 2012. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1469.
- Moreira DS, Neto RLM, Andrade JM, Santi JMM, Reis PG, Frézard F, Murta SMF. 2013. Molecular Characterization of the MRPA Transporter and Antimony Uptake in Four New World *Leishmania* spp. Susceptible and Resistant to Antimony. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 3: 143–153.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. 2011. Cell Biology and Immunology of *Leishmania*. *Immunological Reviews* 240: 286–296.
- Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. 2006. Roles for Mitochondria in Pentamidine Susceptibility and Resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 145: 1–10.
- Musayeib A, Nawal M, Mothana R, Gamal A, Al-Massarani SM, Maes L. 2013. In Vitro Antiprotozoal Activity of Triterpenoid Constituents of *Kleinia odora* Growing in Saudi Arabia. *Molecules* 18: 9207–9218.
- Musuka S, Srivastava S, Dona CWS, Meek C, Leff R, Pasipanodya J, Gumbo T. 2013. Thioridazine Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Parameters ‘Wobble’ during Treatment of Tuberculosis: A Theoretical Basis for Shorter-Duration Curative Monotherapy with Congeners. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 5870–5877.

-
- Muzitano MF, Falcão CA, Cruz EA, Bergonzi MC, Bilia AR, Vincieri FF, Rossi-Bergmann B, Costa SS. 2009. Oral Metabolism and Efficacy of *Kalanchoe pinnata* Flavonoids in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Planta Medica* 75: 307–311.
- Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. 2006. The Antileishmanial Activity Assessment of Unusual Flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* 67: 2071–2077.
- Odds FC. 2003. Synergy, Antagonism, and What the Chequerboard Puts between Them. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 1.
- Odonne G, Herbette G, Eparvier V, Bourdy G, Rojas R, Sauvain M, Stien D. 2011. Antileishmanial Sesquiterpene Lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a Traditional Remedy from the *Chayahuita amerindians* (Peru). Part III. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 875–879.
- Ouellette M, Légaré D, Papadopoulou B. 2001. Multidrug Resistance and ABC Transporters in Parasitic Protozoa. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 201–206.
- Ouellette M. 2001. Biochemical and Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Parasites. *Tropical Medicine and International Health* 6: 874–882.
- Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. 1990. The Amplified H Circle of Methotrexate-Resistant *Leishmania tarentolae* Contains a Novel P-Glycoprotein Gene. *The EMBO Journal* 9: 1027–1033.
- Pajak B, Molnar J, Engi H, Orzechowski A. 2005. Preliminary Studies on Phenothiazine-Mediated Reversal of Multidrug Resistance in Mouse Lymphoma and COLO 320 Cells. *in vivo* 19: 1101–1104.

- Parodi-Talice A, Araújo JM, Torres C, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. 2003. The Overexpression of a New ABC Transporter in *Leishmania* Is Related to Phospholipid Trafficking and Reduced Infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1612: 195–207.
- Passero FFD, Laurenti MD, Santos-Gomes G, Campos BLS, Sartorelli P, Lago JHG. 2013. *In Vivo* Antileishmanial Activity of Plant-Based Secondary. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, edited by Rai MK & Kon KV (Eds.), 95–107. San Diego, USA: Academic Press.
- Passero LFD, Bonfim-Melo A, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH, Toyama DO, Romoff P, Fávero AO, Grecco SS, Zelewsky CA, Lago JHG. 2011. Anti-Leishmanial Effects of Purified Compounds from Aerial Parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitology Research* 108: 529–536.
- Passero LFD, Marques C, Vale-Gato I, Corbett CEP, Laurenti MD, Santos-Gomes G. 2012. Analysis of the Protective Potential of Antigens Released by *Leishmania (Viannia) shawi* Promastigotes. *Archives of Dermatological Research* 304: 47–55.
- Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, Colombara D, Abdoon AO, Mukhtar MM, Mondal D, Esfandiari J, Kumar S, Chun P, Reed SG, Bhatia A. 2010. Design, Development and Evaluation of rK28-Based Point-of-Care Tests for Improving Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: e822.
- Peixoto JA, Silva MLA, Crotti AEM, Veneziani RCS, Gimenez VMM, Januário AH, Groppo M, Magalhães LG, Santos FF, Albuquerque S, Filho AAS, Cunha WR. 2011. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. *Molecules* 16: 1825–1833.
- Pérez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. 2001. ABC Transporters in the Protozoan Parasite *Leishmania*. *International Microbiology* 4: 159–166.

- Pérez-Victoria JM, Bavchvarov BI, Torrecillas IR, Martínez-García M, López-Martín C, Campillo M, Castanys S, Gamarro F. 2011. Sitamaquine Overcomes ABC-Mediated Resistance to Miltefosine and Antimony in *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 3838–3844.
- Piñero J, Temporal RM, Silva-Gonçalves AJ, Jiménez IA, Bazzocchi II, Oliva A, Perera A, Leon LL, Valladares B. 2006. New Administration Model of *trans*-Chalcone Biodegradable Polymers for the Treatment of Experimental Leishmaniasis. *Acta Tropica* 98: 59–65.
- Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. 2001. Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Patients. A Comparative Study. *Medicine* 80: 54–73.
- Piscopo TV, Azzopardi CM. 2007. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 82: 649–657.
- Ponte-Sucre A. 2007. Availability and Applications of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Blockers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 279–286.
- Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P. 2012. Mechanism of Amphotericin B Resistance in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 1031–1041.
- Reimão JQ, Tempone AG. 2011. Investigation into *in vitro* Anti-Leishmanial Combinations of Calcium Channel Blockers and Current Anti-Leishmanial Drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 1032–1038.
- Reithinger R, Davies CR. 1999. Is the Domestic Dog (*Canis familiaris*) a Reservoir Host of American Cutaneous Leishmaniasis? A Critical Review of the Current Evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 530–541.

- Reithinger R, Dujardin JC. 2007. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 21–25.
- Reithinger R, Espinoza JC, Davies CR. 2003. The Transmission Dynamics of Canine American Cutaneous Leishmaniasis in Huánuco, Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 473–480.
- Roohparvar R, Huser H, Zwiers LH, Waard MA. 2007. Control of *Mycosphaerella graminicola* on Wheat Seedlings by Medical Drugs Known to Modulate the Activity of ATP-Binding Cassette Transporters. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5011–5019.
- Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC, Yunes R, Cechinel-Filho V, Boeck E. 2012. [PI0204079-4] Síntese E Uso de Chalconas Para O Tratamento de Doenças Parasitárias. Universidade Federal do Rio de Janeiro e Universidade Federal de Santa Catarina.
- Saenz RE, Paz H, Berman JD. 1990. Efficacy of Ketoconazole against *Leishmania braziliensis* and *panamensis* Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Medicine* 89: 147–155.
- Sahni GS. 2012. Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) without Splenomegaly. *Indian Pediatrics* 49: 590–591.
- Santarem AAA, Greggianin GF, Debastiani FG, Ribeiro JBP, Polli DA, Sampaio RNR. 2014. Effectiveness of Miltefosine-Pentoxifylline Compared to Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in C57Bl/6 Mice. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 517–520.
- Santos-Gomes GM, Abranches P. 1996. Comparative Study of Infectivity Causes by Promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitologica* 43: 7–12.

- Saurin W, Hofnung M, Dassa E. 1999. Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution* 48: 22–41.
- Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. 2009. The Role of ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins in Protozoan Parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 167: 81–94.
- Schneider E, Hunke S. 1998. ATP-Binding-Cassette (ABC) Transport Systems: Functional and Structural Aspects of the ATP-Hydrolyzing Subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 1–20.
- Sen G, Biswas D, Ray M, Biswas T. 2007. Albumin-Quercetin Combination Offers a Therapeutic Advantage in the Prevention of Reduced Survival of Erythrocytes in Visceral Leishmaniasis. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 39: 245–254.
- Sen G, Mandal S, Roy SS, Mukhopadhyay S, Biswas T. 2005. Therapeutic Use of Quercetin in the Control of Infection and Anemia Associated with Visceral Leishmaniasis. *Free Radical Biology & Medicine* 38: 1257–1264.
- Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T. 2008. Quercetin Interferes with Iron Metabolism in *Leishmania donovani* and Targets Ribonucleotide Reductase to Exert Leishmanicidal Activity. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1066–1075.
- Sharma U, Singh S. 2008. Insect Vectors of *Leishmania*: Distribution, Physiology and Their Control. *Journal of Vector Borne Diseases* 45: 255–272.
- Shivahare R, Korthikunta V, Chandasana H, Suthar MK, Agnihotri P, Vishwakarma P, Chaitanya TK, Kancharla P, Khaliq T, Gupta S, Bhatta RS, Pratap JV, Saxena JK, Gupta S, Tadigoppula N. 2014. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Biological Studies of Chromenochalcones as Potential Antileishmanial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 57: 3342–3357.

- Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, Nosratabadi J, Hakimi Parizi M, Barati M. 2012. The Effect of Verapamil on *in vitro* Susceptibility of Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania tropica* to Meglumine Antimoniate. *Parasitology Research* 110: 1113–1117.
- Silva CIM. 2014. *Eficácia Da Quercetina Na Leishmaniose Visceral Murina: Associação Com a Chalcona CH8, Formulações Nanoestruturadas E Imunomodulação*. Thesis Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro: 1-148.
- Silva ER, Maquiaveli MC, Magalhães PP. 2012. The Leishmanicidal Flavonols Quercetin and Quercitrin Target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Arginase. *Experimental Parasitology* 130: 183–188.
- Silva N, Camacho N, Figarella K, Ponte-Sucre A. 2004. Cell Differentiation and Infectivity of *Leishmania mexicana* Are Inhibited in a Strain Resistant to an ABC-Transporter Blocker. *Parasitology* 128: 629–634.
- Singh N, Almeida R, Kothari H, Kumar P, Mandal G, Chatterjee M, Venkatachalam S, Govind MK, Mandal SK, Sundar S. 2007. Differential Gene Expression Analysis in Antimony-Unresponsive Indian Kala Azar (visceral Leishmaniasis) Clinical Isolates by DNA Microarray. *Parasitology* 134: 777–787.
- Singh N. 2006. Drug Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. *The Indian Journal of Medical Research* 123: 411–422.
- Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, Fischer C, Voss A, Berman J. 2001. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. *Clinical Infectious Diseases* 33: 57–61.
- Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, Dos Santos LM, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MA, Vieira LQ. 2014. Neutrophils Have a Protective Role during Early Stages of *Leishmania amazonensis* Infection in BALB/c Mice. *Parasite Immunology* 36: 13–31.

-
- Souza LW, Souza SV, Botelho AC. 2012. Comparative Analysis of the Geographic Distribution of the Histopathological Spectrum and *Leishmania* Species of American. *The journal Brazilian Annals of Dermatology* 87: 369–374.
- Spengler G, Takács D, Horváth A, Riedl Z, Hajós G, Amaral L, Molnár J. 2014. Multidrug Resistance Reversing Activity of Newly Developed Phenothiazines on P-Glycoprotein (ABCB1)-Related Resistance of Mouse T-Lymphoma Cells. *Anticancer Research* 34: 737–741.
- Spillman NJ, Allen RJ, Kirk K. 2013. Molecular & Biochemical Parasitology Na + Extrusion Imposes an Acid Load on the Intraerythrocytic Malaria Parasite. *Molecular & Biochemical Parasitology* 189: 1–4.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. 2012. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 1–6.
- Suvadra D, Roy P, Mondal S, Bera T, Mukherjee A. 2013. One Pot Synthesis of Gold Nanoparticles and Application in Chemotherapy of Wild and Resistant Type Visceral Leishmaniasis. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces* 107: 27–34.
- Tan N, Kaloga M, Radtke OA, Kiderlen AF, Oksüz S, Ulubelen A, Kolodziej H. 2002. Abietane Diterpenoids and Triterpenoic Acids from *Salvia cilicica* and Their Antileishmanial Activities. *Phytochemistry* 61: 881–884.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and their Analogues: *in vitro*, *in vivo*, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1352-1364.
- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Sousa W. 2013. *Atlas Didático: Ciclo de Vida Da Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ.

- Torres-Santos EC, Da Silva SA, Costa SS, Santos AP, Almeida AP, Rossi-Bergmann B. 2003. Toxicological Analysis and Effectiveness of Oral *Kalanchoe pinnata* on a Human Case of Cutaneous Leishmaniasis. *Phytotherapy Research* 17: 801–803.
- Torres-Santos EC, Lopes D, Oliveira RR, Carauta JP, Falcao CA, Kaplan MA, Rossi-Bergmann B. 2004. Antileishmanial Activity of Isolated Triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* 11: 114–120.
- Torres-Santos EC, Rodrigues JM, Moreira DL, Kaplan MAC and Bartira, Rossi-Bergmann B. 1999. Improvement of *in vitro* and *in vivo* Nanoparticles Improvement of *in vitro* and *in vivo* Antileishmanial Activities of 2 J , 6 J -Dihydroxy-4 J -Methoxychalcone by Entrapment in Poly (D , L -Lactide) Nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1776–1778.
- Torres-Santos EC, Sampaio-Santos MI, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb M, Urbina JA, Rossi-Bergmann B. 2009. Altered Sterol Profile Induced in *Leishmania amazonensis* by a Natural Dihydroxymethoxylated Chalcone. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63: 469–472.
- Toté K, Vanden Berghe D, Levecque S, Bénéré E, Maes L, Cos P. 2009. Evaluation of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants in a New Resazurin Microplate Method for Rapid Efficacy Testing of Biocides. *Journal of Applied Microbiology* 107: 606–615.
- Vale-Costa S, Vale N, Matos J, Tomás A, Moreira R, Gomes P, Gomes MS. 2012. Peptidomimetic and Organometallic Derivatives of Primaquine Active against *Leishmania infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 5774–5781.
- Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Fähnrich E, Kern WV, Amaral L. 2008. Demonstration of Intrinsic Efflux Activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an Automated Ethidium Bromide Method. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31: 458–462.

- Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, Amaral L. 2010. Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-Automated Fluorometric System. *Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition, Methods in Molecular Biology* Edited by Gillespie SH, McHugh TD. 159-172.
- Voukeng IK, Kuete V, Dzoyem JP, Fankam AG, Noumedem JA, Kuate JR, Pages JM. 2012. Antibacterial and Antibiotic-Potential Activities of the Methanol Extract of Some Cameroonian Spices against Gram-Negative Multi-Drug Resistant Phenotypes. *BMC Research Notes* 5: 299.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. Distantly related sequences in the a- and f-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* 1: 945–951.
- WHO. 2010. Control of the Leishmaniasis. *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*, Geneva, 22-26 March 2010. *WHO Technical Report Series* 949.
- WHO. 2013. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. *Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases* 39: 67–71.
- Wong IL, Chow LM. 2006. The Role of *Leishmania enriettii* Multidrug Resistance Protein 1 (LeMDR1) in Mediating Drug Resistance Is Iron-Dependent. *Molecular and Biochemical Parasitology* 150: 278–287.
- Yamamoto ES, Campos BL, Laurenti MD, Lago JH, Grecco Sdos S, Corbett CE, Passero LF. 2014. Treatment with Triterpenic Fraction Purified from *Baccharis uncinella* Leaves Inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Spreading and Improves Th1 Immune Response in Infected Mice. *Parasitology Research* 113: 333–339.
- Yang K, Wu J, Li X. 2008. Recent Advances in Research on P-Glycoprotein Inhibitors. *BioScience Trends* 2: 137–146.

V. Referências Bibliográficas

Yin N, Ma W, Pei J, Ouyang Q, Tang C, Lai L. 2014. Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. *PloS One* 9: e93960.

Zvulunov A, Klaus S, Vardy D. 2002. Fluconazole for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine* 347: 370–371.