

Tânia Vanessa Soares Branco Micaelo

Preparação de triterpenóides de núcleo ursano e avaliação da atividade antiparasitária em *Leishmania*

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e a coorientação do Professor Jorge Salvador, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2017

• U



C •

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Tânia Vanessa Soares Branco Micaelo

Preparação de triterpenóides de núcleo ursano e avaliação da atividade antiparasitária em *Leishmania*

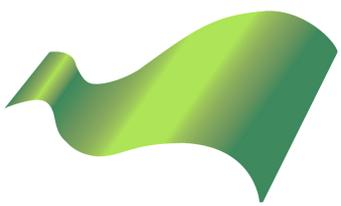
Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Sousa e a coorientação do Professor Jorge Salvador, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Coimbra, Janeiro de 2017

A investigação apresentada nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e a coorientação do Professor Jorge Salvador, no âmbito do Mestrado em Química Farmacêutica Industrial.

O presente trabalho foi financiado pelo FEDER através do programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE) e pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do Projeto PEst-C/SAU/LA000172013-2017.

FCT
Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



COMPETE
PROGRAMA OPERACIONAL FACTORES DE COMPETITIVIDADE

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Maria do Céu Sousa, por todos os conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sem a sua orientação não conseguiria terminar esta fase tão importante.

Agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Jorge Salvador por ter proporcionado, em conjunto com a Professora Doutora Maria do Céu Sousa, a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Helito Volpato e Débora Scariot, por todo o auxílio quando e sempre que precisei, por todos os conhecimentos transmitidos, por toda a paciência e amizade, foram sem dúvida indispensáveis na realização deste trabalho.

À colega de laboratório Ágata Lourenço por estar sempre pronta a ajudar. À Sandra Ferreira, assistente do laboratório, pela colaboração e atenção prestada. A todas as funcionárias da FFUC que sempre se demonstraram dispostas a ajudar no que fosse possível e a demonstrar a maior simpatia.

A todos os amigos que me acompanharam nesta longa jornada e um agradecimento especial à Andreia Alves e Ana Maria Alves pelo companheirismo e apoio nos últimos anos.

Agradeço aos meus pais por terem proporcionado todos estes anos de aprendizagem e crescimento pessoal. Também pela persistência que possibilitou o termino desta etapa da minha vida.

À minha irmã, que estando do outro lado do Atlântico, esteve e está sempre comigo.

À minha família, em especial às minhas tiazinhas, pelos fins de semanas, pelo carinho e apoio que sempre me deram que também contribuiu também para que eu conseguisse realizar este trabalho.

À Lara Pereira por me acompanhar desde sempre. Pelo apoio, paciência e a amizade de e para uma vida.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao Hélder Soares, o meu melhor amigo e namorado, por tudo! Pelo companheirismo, paciência, carinho, força, amizade e aprendizagem. Contribuiu em muito, para que conseguisse finalizar esta tese de mestrado.

Muito Obrigada a todos!

Índice

Índice de Tabelas	iii
Índice de Figuras	iv
Abreviaturas	vi
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo I - INTRODUÇÃO	3
1.1. Nomenclatura e Taxonomia de <i>Leishmania</i>	4
1.2. Morfologia e ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	6
1.2.1. Morfologia de <i>Leishmania</i>	7
1.2.2. Vetores de infecção e hospedeiros vertebrados	8
1.2.3. Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no hospedeiro vertebrado	9
1.2.4. Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no hospedeiro invertebrado	11
1.3. Manifestações clínicas da leishmaniose	12
1.3.1. Leishmaniose visceral	13
1.3.2. Leishmaniose cutânea	13
1.3.3. Leishmaniose mucocutânea	13
1.4. Epidemiologia	14
1.5. Desenvolvimento de vacinas	15
1.6. Tratamento	16
1.6.1. Quimioterapia parental	16
1.6.1.1. Antimoniiais pentavalentes	16
1.6.1.2. Anfotericina B	17
1.6.1.3. Pentamidina	18
1.6.1.4. Paramomicina	18
1.6.2. Quimioterapia oral	19
1.6.2.1. Miltefosina	19
1.6.3. Formulações tópicas	19
1.6.5. Produtos naturais derivados de plantas	20
1.6.5.1. Ácido ursólico e derivados	20
Capítulo II - OBJETIVOS	25

Capítulo III - MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Compostos	29
3.2. Estudos de susceptibilidade	29
3.2.1. Origem e cultura de <i>Leishmania</i>	29
3.2.2 Estudos de viabilidade celular em promastigotas	29
3.2.3 Estudos da interação parasita-hospedeiro	30
3.3. Estudo de citotoxicidade em células animais	31
3.4. Estudo morfológico por microscopia óptica	32
3.5. Determinação dos níveis intracelulares de Ca ²⁺	33
3.6. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio	33
3.7. Citometria de fluxo	34
3.7.1. Estudo do ciclo celular	34
3.7.2. Estudo da apoptose/necrose	35
3.7.3. Estudo da integridade da membrana celular	36
3.7.2. Estudo do volume celular	36
3.8. Análise estatística	37
Capítulo IV - RESULTADOS	41
4.1 Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados triterpenóides do ácido ursólico em promastigotas	41
4.2. Citotoxicidade em células de mamífero	43
4.3. Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados triterpenóides do ácido ursólico em amastigotas intracelulares	44
4.4. Efeitos no volume e integridade da membrana celular de promastigotas <i>Leishmania infantum</i>	46
4.5. Paragem do ciclo celular em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	51
4.6. Alterações dos níveis intracelulares de Ca ²⁺ e das espécies reativas de oxigênio	53
4.7. Alterações morfológicas observadas em microscopia óptica	55
Capítulo V – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	59
Referências Bibliográficas	65

Índice de Tabelas

Tabela 1: Concentração inibitória a 50% (CI_{50}) dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .	42
Tabela 2: Concentração citotóxica a 50% (CC_{50}) dos derivados do ácido ursólico em macrófagos (células RAW 264.7).	44
Tabela 3: Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> marcados com anexina-V e IP após exposição ao composto 48.	51
Tabela 4: Efeitos do composto 48 no ciclo celular de <i>Leishmania infantum</i> .	53

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no intestino do vetor feblotomíneo.	4
Figura 2: Taxonomia de <i>Leishmania</i> .	5
Figura 3: Morfologia de <i>Leishmania</i> e principais organitos: a) forma promastigota e b) amastigota.	8
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	10
Figura 5: Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no trato digestivo do vetor.	11
Figura 6: Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral; (B) Leishmaniose cutânea; (C) Leishmaniose mucocutânea.	14
Figura 7: Distribuição geográfica das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea e mucocutânea; (B) Leishmaniose visceral.	14
Figura 8: Estrutura química do Estibogluconato de sódio.	17
Figura 9: Estrutura química da Anfotericina B.	17
Figura 10: Estrutura química da Pentamidina.	18
Figura 11: Estrutura química da Paramomicina.	18
Figura 12: Estrutura química do Ácido Ursólico.	20
Figura 13: Esquema representativo da passagem de células em fluxo no citómetro de fluxo.	34
Figura 14: Efeito dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .	41
Figura 15: Efeitos citotóxicos dos derivados do ácido ursólico em macrófagos (células RAW 264.7).	43

Figura 16: Imagens obtidas por microscopia óptica dos macrófagos peritoneais infectados <i>in vitro</i> por amastigotas <i>Leishmania infantum</i> após incubação durante 24 horas a 26°.	45
Figura 17: Efeito do composto 48 na viabilidade dos amastigotas intracelulares <i>Leishmania infantum</i> .	46
Figura 18: Análise do volume celular por citometria de fluxo de promastigotas <i>Leishmania infantum</i> não tratados e tratados com o composto 48 e miltefosina.	47
Figura 19: Histogramas representativos de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratados com o composto 48 e marcados por IP.	48
Figura 20: Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> marcados com IP após 24 horas de incubação na ausência e presença do derivado 48, na Cl_{50} , $2xCl_{50}$ e digitonina.	49
Figura 21: Histogramas representativos da percentagem de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> marcados por IP e anexina-V após exposição ao composto 48.	50
Figura 22: Histogramas representativos do conteúdo de DNA de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> expostos ao composto 48.	52
Figura 23: Distribuição de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> pelas diferentes fases do ciclo celular, após exposição ao derivado 48 na Cl_{50} .	53
Figura 24: Níveis de cálcio citosólico em promastigotas <i>Leishmania infantum</i> expostos ao composto 48.	54
Figura 25: Geração de espécies reativas de oxigénio na presença do composto 48 à Cl_{50} e $2xCl_{50}$.	55
Figura 26: Observação por microscopia de contraste de fases dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .	56
Figura 27: Observação por microscopia óptica dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> após coloração de Giemsa.	56

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AmB	<i>Amphotericin B</i>
AO	Ácido Oleónico
AU	Ácido Ursólico
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
CI ₅₀	Concentração inibitória a 50%
DCF	2', 7'-diclorofluoresceína
ADHB	Ácido 2, 3-dihidrobencóico
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid</i>
Fluo-4/AM	Éster fluo-4 acetoximetil
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GSP	Gel secretor dos promastigotas
H ₂ DCFDA	Diacetato 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
IP	Iodeto de propídio
IS	Índice de seletividade
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kADN	Ácido desoxirribonucleico cinetoplastida
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LDPK	Leishmaniose dérmica pós-kala azar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LR	Leishmaniose recidivante
LV	Leishmaniose visceral
EMLE	Eletroforese multi-locus de enzimas
MON	Monpellier
MP	Matriz peritrófica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	RCP-polimorfismo de restrição no comprimento do fragmento
PS	Fosfatidilserina
RNAse	Ribonuclease
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SSG	<i>Sodium Stibogluconate</i>
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VP	Vacúolo parasitário

Resumo

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, endêmica em 98 países e afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. É causada por parasitas protozoários que são transmitidos ao Homem através da picada de flebótomos fêmea infetados e pode manifestar-se de três formas, cutânea, visceral e mucocutânea, dependendo da espécie de *Leishmania*.

O tratamento disponível para a leishmaniose não variou significativamente desde o início do século XX, baseando-se no uso de metais pesados, como compostos antimoniais. O tratamento continua a ser um problema devido à elevada toxicidade, custo e efeitos secundários, que justifica a procura urgente de novas moléculas potencialmente ativas, mais eficientes e menos tóxicas. A investigação de novos compostos com atividade antileishmanicida tem vindo a ser realizada pelo mundo inteiro.

Os triterpenos são um grupo de moléculas conhecidas pela larga versatilidade e atividade biológica e representam uma fonte na procura de substâncias bioativas. Estes compostos já demonstraram atividade contra *Leishmania sp.*

No presente estudo, avaliou-se a atividade anti-*Leishmania* de 19 triterpenóides de núcleo ursano em *Leishmania infantum*. Sete compostos apresentaram atividade ($IC_{50} < 200 \mu M$) e destes, três compostos, 45, 48 e 196 foram mais promissores com $IC_{50} < 50 \mu M$.

O composto 48 foi o mais ativo e induziu efeito antiproliferativo em promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*, com redução na sobrevivência de promastigotas e amastigotas intracelulares em macrófagos.

De forma a elucidar possíveis mecanismos responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* foram realizados estudos morfológicos, avaliação da morte celular por apoptose/necrose, ciclo celular, e determinação dos níveis de Ca^{2+} e das espécies reativas de oxigénio.

O composto 48 induziu alterações no ciclo celular do parasita, com retenção das células na fase G0/G1 sugerindo uma paragem no ciclo celular. A quantificação de cálcio e espécies reativas de oxigénio mostraram que o composto 48 induz desequilíbrio homeostático de cálcio e aumento do nível de ROS, sendo que estes resultados podem estar associados à morte celular por apoptose. O composto 48 também induziu alterações morfológicas nos parasitas com diminuição do volume celular.

Em conclusão, este trabalho permitiu identificar o composto 48 como o derivado triterpenóide mais ativo e promissor em promastigotas e amastigotas intracelulares de

Leishmania infantum que pode ser aplicado no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, leishmaniose, triterpenóides, susceptibilidade, promastigotas, amastigotas, apoptose/necrose, ciclo celular, ROS, Ca²⁺ intracelular.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, endemic in 98 countries affecting 12 million people worldwide. This disease is caused by the protozoan parasites which are transmitted to men by the bite of infected female phlebotomine sandflies. There are three main forms of leishmaniasis - cutaneous, visceral and mucocutaneous.

Current treatments rely on heavy metals, like antimonial compounds, that are associated with adverse side effects due to significant off target toxicity and also with high production cost, making urgent the need for more efficient and less toxic new active molecules.

Triterpenoids are a group of molecules known by their versatility and biological activity representing a source of new bioactive substances with anti-*Leishmania* activity.

In this study, 19 triterpenoids with ursane nucleus were evaluated on *Leishmania infantum*. Seven of these compounds presented significant activity ($IC_{50} < 200 \mu M$) and compounds 45, 48 and 196 were selected as promising molecules ($IC_{50} < 50 \mu M$) and were further studied.

Compound 48 proved to be the most active molecule, inducing an antiproliferative effect in intracellular promastigotes and amastigotes of both *Leishmania infantum* and macrophages.

Studies of morphology, cellular death mechanisms, cell cycle, and intracellular quantification of Ca^{2+} and levels of reactive oxygen species (ROS) were conducted in order to elucidate the mode of action of this compound.

It is also shown that this molecule induces modification on the parasite cell cycle with arrest on G0/G1 phase. The quantification of Ca^{2+} and ROS showed a homeostatic imbalance of calcium and an increase on ROS levels, being these results associated with apoptotic cell death. It was also observed shrinkage on cell volume.

This work allowed to identify a new triterpenoid derivative more active against intracellular promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* which can be seen as promising new therapeutic alternative in the near future for the treatment Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*, leishmaniasis, triterpenoids, susceptibility, promastigotas, amastigotas, apoptose/necrosis, cellular cycle, ROS, intracellular Ca^{2+} .

Capítulo I

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* engloba várias espécies de parasitas hemoflagelados da família Trypanosomatidae. *Leishmania* spp. são protozoários digenéticos, alternando entre duas formas morfológicas distintas, amastigotas intracelulares em hospedeiros vertebrados e promastigotas flagelados no vetor invertebrado. O parasita é transmitido pela picada do mosquito de areia, fêmea *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*, podendo causar doenças infecciosas (não contagiosas) designadas de leishmanioses.

A leishmaniose divide-se em duas categorias: tipo zoonose, na qual o hospedeiro é um animal vertebrado, selvagem ou doméstico e do tipo antropozoonose, cujo hospedeiro é o homem. Pode manifestar-se de três principais formas clínicas: cutânea, mucocutânea ou visceral, variando desde simples úlceras cutâneas a destruições massivas de tecidos cutâneos e subcutâneos, ou de órgãos como o fígado e baço.

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas a nível mundial, afetando na sua maioria países subdesenvolvidos, com valores estatísticos assustadores como 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença, 2 milhões de novos casos de infecção por ano.

Estes valores têm vindo a crescer ao longo dos últimos anos por vários motivos. Para além dos fatores de risco como condições socioeconómicas, a migração, alterações ambientais e climatéricas, ainda não há um tratamento efetivo no combate à leishmaniose. Os tratamentos disponíveis apresentam limitações como a elevada toxicidade e consequente duração limitada do tratamento (28 a 30 dias), o elevado custo e a especificidade para determinadas espécies de *Leishmania* em determinadas regiões geográficas.

Nos últimos 10 anos, a investigação clínica tem-se centrado principalmente no tratamento, diagnóstico e prevenção da leishmaniose, bem como na redução dos custos de alguns dos medicamentos leishmanicidas. Contudo, a implementação de programas de controlo são ainda raros e a mortalidade e morbilidade devido a leishmaniose apresenta uma tendência de crescimento preocupante.

Leishmania infantum é um dos agentes etiológicos responsáveis pela leishmaniose visceral, afetando principalmente crianças. O número de casos de coinfeção em pacientes adultos seropositivos para o HIV sofreu nos últimos anos um dramático aumento na Bacia do Mediterrâneo, outra evidência da elevada necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos e mais eficazes fármacos leishmanicidas.

I.1. Nomenclatura e Taxonomia de *Leishmania*

A leishmaniose é conhecida há centenas de anos e a primeira descrição clínica data de 1756 por Alexander Russel que a denominou de “Aleppo boil”. Devido à existência de focos da doença espalhados por várias zonas geográficas e por uma natural falta de unificação de nomenclatura, este tipo de doença foi conhecendo ao longo da sua história diferentes nomes, onde se destacam Kala-azar, febre Dum-dum e leprose branca. Também foram várias as classificações usadas para *Leishmania*^{i,ii}.

Na viragem do século XIX, de forma independente, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, identificaram o parasita que causava a leishmaniose, à qual Ronald Ross deu o nome genérico de *Leishmania*.

Entre 1916 e 1987 foi proposta uma classificação com base na conjugação de características comuns para as diferentes espécies de *Leishmania*, dividindo-as em dois subgéneros: *Leishmania*, presente no Velho e Novo Mundo e *Viannia*, presente apenas no Novo Mundo.

A classificação destes dois subgéneros teve como base o local do trato gastrointestinal do vetor onde ocorria o desenvolvimento das espécies. No subgénero *Leishmania*, o crescimento do parasita é restringido à zona anterior ao piloro, na junção do intestino médio e intestino posterior (Fig. 1), enquanto que o crescimento das espécies do subgénero *Viannia* ocorre no intestino médio e intestino posterior. A classificação das espécies era baseada apenas em fatores extrínsecos e ecobiológicos, tais como, fatores e manifestações clínicas, distribuição geográfica, tropismo e vetores de transmissão^{ii,iii}.

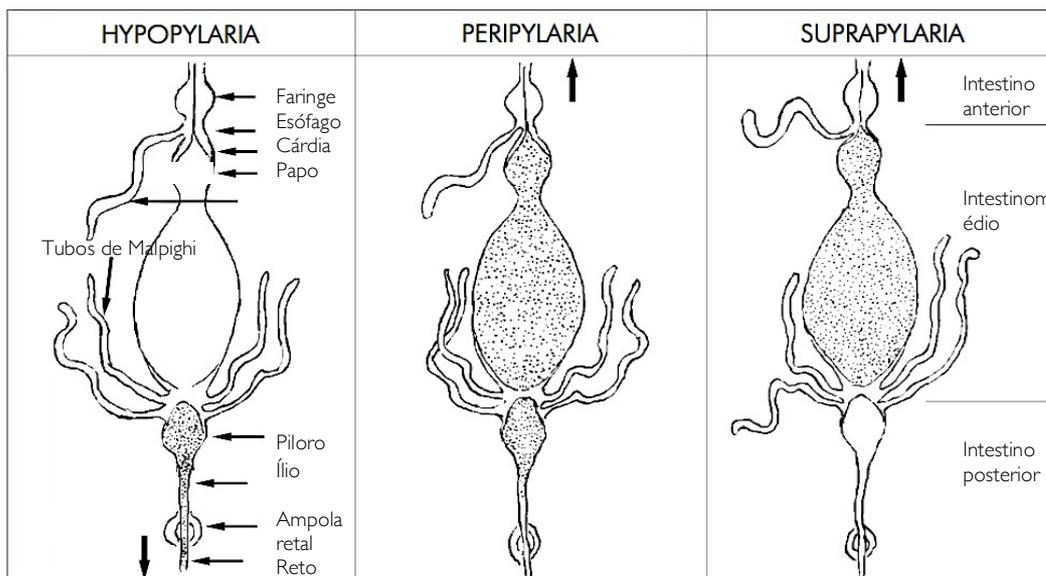


Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento de *Leishmania* no intestino do vetor feblotomíneo. Adaptado de L. Ralph, Espécies neotropicais de *Leishmania* uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude 2010; 1(2):13-32

A partir dos anos 80, métodos intrínsecos começaram a fazer parte da classificação das diferentes espécies de *Leishmania*. Inicialmente eram classificações fenéticas, baseando-se no fenótipo e características fisiológicas, e posteriormente, devido ao avanço da biotecnologia, seriam substituídas pela tipagem isoenzimática. Esta técnica, que analisa isoenzimas por eletroforese *multi-locus* de enzimas (EMLE), rapidamente se tornou a técnica de eleição para a identificação das espécies, essencialmente devido à facilidade de implementação e à fiabilidade de resultados. As isoenzimas são consideradas diferentes formas alélicas de um gene e a variação enzimática num determinado *locus* representa uma mutação formada durante a evolução. O método caracteriza e agrupa as diferentes estirpes, com perfis isoenzimáticos semelhantes, em unidades taxonómicas designadas por zimodemos ^{iv}.

Outros métodos foram adaptados com base na reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR-polimorfismo de restrição no comprimento do fragmento (PCR-RFLP), multiplex PCR e PCR seguida de sequenciação ^{iv, v}. Estes métodos confirmaram a divisão nos dois subgéneros já estabelecidos por Lainson e Shaw, validando a identificação de critérios intrínsecos e extrínsecos.

Novos métodos de deteção, isolamento e identificação genética têm resultado num aumento substancial do número de espécies descritas (Fig. 2). Atualmente são conhecidas 30 espécies e aproximadamente 20 são patogénicas para os seres humanos ⁱⁱ.

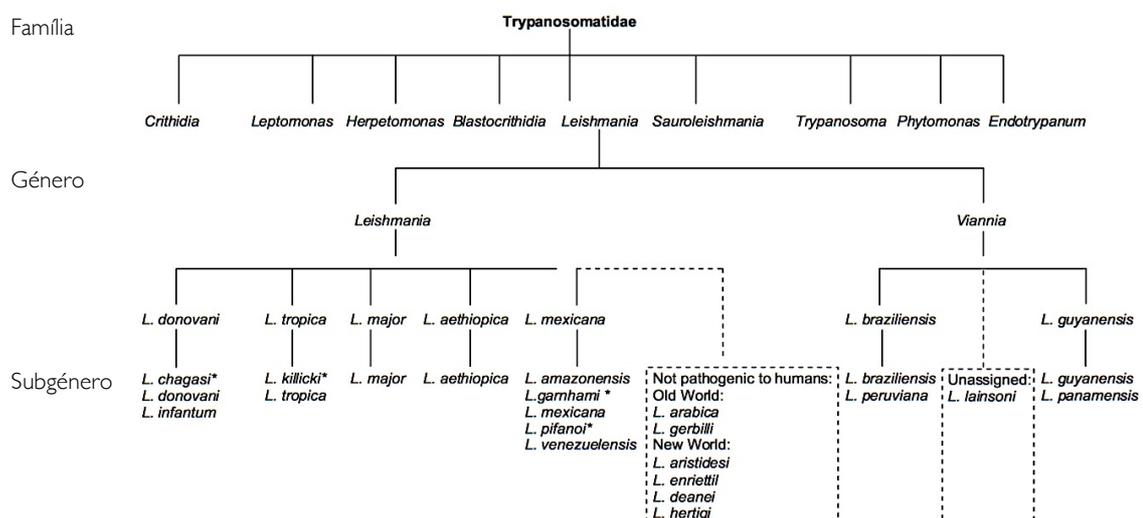


Figura 2: Taxonomia de *Leishmania*. Adaptado de OMS 2010.

Lanotte, em 1981, identificou dois zimodemos em *Leishmania infantum*. Anos mais tarde, com o desenvolver das técnicas, Pratlong (2001) descreveu 31 zimodemos na espécie *L. infantum*. Atualmente, estão descritos 37 diferentes zimodemos e praticamente todos eles

foram encontrados no homem e apenas 12 foram detetados no cão, podendo também ser encontrados em outros mamíferos como raposas, gatos e ratos.

O zimodemo MON-1 de *L. infantum* predomina entre todos os hospedeiros, possuindo o maior número de estirpes e maior distribuição geográfica, incluindo a Europa do sul, África e Médio Oriente. Outro zimodemo, MON-24, apresenta elevada distribuição geográfica na Bacia do Mediterrâneo e pode ser encontrado em seres humanos e em cães. Os outros 35 zimodemos encontram-se distribuídos em áreas geográficas mais restritas^{vi}.

L. infantum é tipicamente responsável pela leishmaniose visceral no Novo Mundo, mas também, ainda que menos ocorrente, por casos de leishmaniose cutânea em regiões endémicas^{vii} e afeta maioritariamente crianças com idade inferior a dez anos. É um parasita oportunista em pacientes imunodeprimidos, especialmente com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Na Bacia Mediterrânica, mais de 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos está associada à infeção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e 9% das pessoas com SIDA sofrem de recém-adquirida ou reativada leishmaniose visceral^{viii}.

I.2. Morfologia e ciclo de vida de *Leishmania*

Os parasitas de *Leishmania* são organismos digenéticos, ou seja, o seu ciclo de vida é dividido em duas fases diferentes, nomeadamente, a fase extracelular, que ocorre no hospedeiro invertebrado e a fase intracelular, que ocorre no hospedeiro mamífero vertebrado. O parasita apresenta diferentes formas morfológicas transformando-se na forma promastigota no hospedeiro invertebrado e na amastigota no hospedeiro vertebrado.

A transmissão dos protozoários para o hospedeiro vertebrado ocorre através da picada de fêmeas de insetos do género *Phlebotomus*, encontrados em países do chamado Velho Mundo, ou *Lutzomyia*, encontrados em países do Novo Mundo, injetando promastigotas infecciosos aquando da refeição de sangue. Os parasitas invadem os macrófagos de mamíferos por endocitose mediada por receptores onde se transformam em amastigotas que se multiplicam assexuadamente por fissão binária.

Os flebotomos, numa refeição de sangue, ficam infetados por ingestão de células parasitadas, a partir de um ser humano ou animal infetado. Os amastigotas transformam-se em promastigotas e desenvolvem-se no intestino em promastigotas metacíclicas, forma infecciosa para o homem^{ix}.

1.2.1. Morfologia de *Leishmania*

O ciclo de vida de *Leishmania* é um processo complexo e os diferentes ambientes no qual ocorre expõem o protozoário a condições variadas (nutrientes disponíveis, pH, temperatura, oxigênio disponível), obrigando-o a adaptar-se, diferenciando-se em duas principais formas com diferentes padrões de expressão genética, estado de divisão celular e morfologias distintas, promastigotas e amastigotas (Fig. 3) ^{x, xi, xii}.

No hospedeiro invertebrado assume a forma promastigota (Fig. 3 a). Esta forma possui flagelo, que lhe confere mobilidade e permite a sua fixação no epitélio intestinal do inseto vetor, e o corpo é alongado, com cerca de 15 a 30 um de comprimento.

No meio intracelular, *Leishmania* diferencia-se na forma amastigota (Fig. 3 b). A sua fisionomia passa a ser arredondada, com 2 a 6 um de diâmetro. O flagelo é curto e atrofiado, como que inexistente, não ultrapassando a membrana celular ^{xiii}. Apesar destas poucas, mas evidentes, diferenças estruturais, os organitos que constituem as duas formas do parasita são os mesmos, nos quais se incluem o núcleo, o complexo de Golgi, cinetoplasto e uma mitocôndria. O núcleo é arredondado e ocupa posição central na célula. Ao redor do núcleo e por todo o citoplasma há uma rede de túbulos – o retículo endoplasmático rugoso – que compartilha da mesma função nas células de mamíferos (síntese de proteínas). O complexo de Golgi é responsável pelas mesmas funções realizadas nas células de mamíferos, a glicosilação e direcionamento de proteínas.

Os parasitas da ordem Kinetoplastidae apresentam estruturas e organelos semelhantes às células de mamíferos, nomeadamente o complexo de Golgi e núcleo. No entanto, também apresentam diferenças na morfologia celular que, por serem específicas desse grupo, são importantes alvos terapêuticos, como a única mitocôndria e o cinetoplasto ^{xiv}.

A mitocôndria nos protozoários da ordem Kinetoplastidae estende-se por todo o corpo celular e possui ramificações. O facto do parasita depender da função de uma única mitocôndria, torna-a de facto um alvo terapêutico bastante atrativo ^{xv, xvi}.

No interior da mitocôndria encontra-se uma estrutura em forma de bastão entre o flagelo e o núcleo, denominada cinetoplasto, onde se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) ^{xvii, xviii}.

Ambas as formas parasitárias apresentam componentes das vias de exocitose e lisossomal, apesar de existirem diferenças na quantidade, volume e localização celular dos organelos ^{xix}. Em síntese, as maiores diferenças entre os dois estados residem na forma e no tamanho dos componentes e não na sua composição celular ^{xx}.

No interior da mitocôndria encontra-se uma estrutura em forma de bastão entre o flagelo e o núcleo, denominada cinetoplasto, onde se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) ^{xx, xxi}.

Ambas as formas apresentam componentes das vias de exocitose e lisossomal, apesar de existirem diferenças na quantidade, volume e localização celular dos organelos^{xxii}. Em síntese, as maiores diferenças entre os dois estados residem na forma e no tamanho dos componentes e não na sua composição celular^{xvi}.

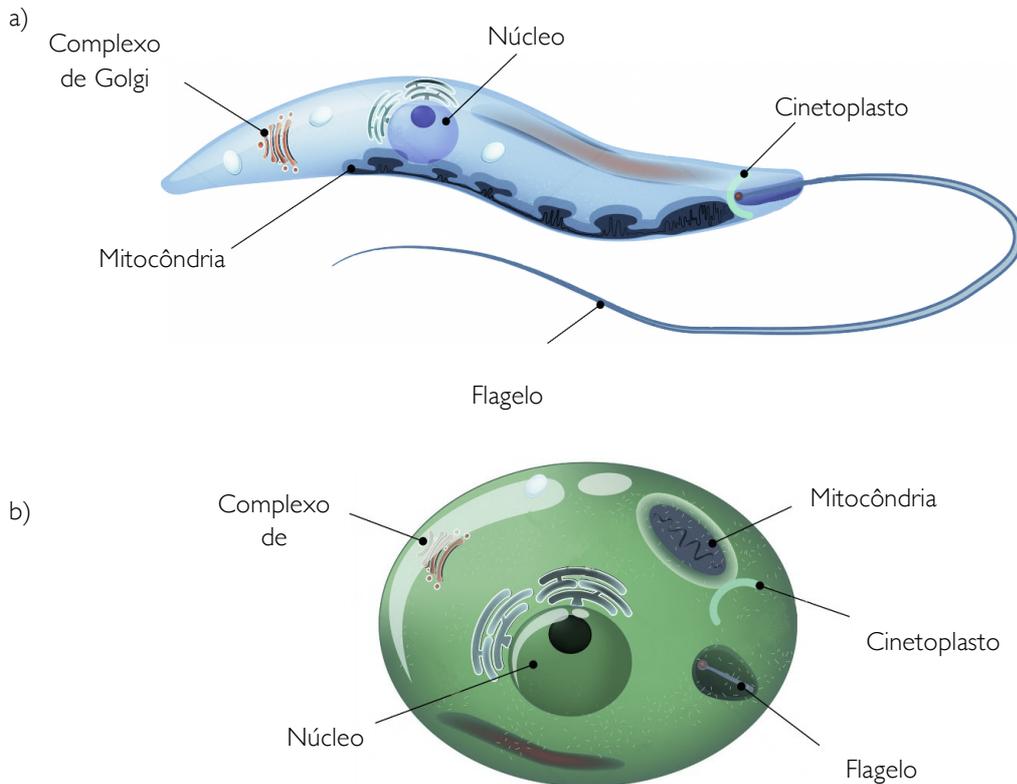


Figura 3: Morfologia de Leishmania e principais organitos: a) forma promastigota e b) amastigota. (Adaptado de <https://www.shutterstock.com/search/leishmaniasis>).

1.2.2. Vetores de infecção e hospedeiros vertebrados

O sistema ecológico em que o parasita *Leishmania* se desenvolve é composto por um pequeno número de vetores das espécies flebotomínicas e uma ou várias espécies de reservatórios vertebrados, havendo geralmente um hospedeiro/reservatório principal para determinado foco.

A leishmaniose pode ser dividida em duas categorias de acordo com a fonte de infecção humana: zoonose, na qual o hospedeiro é um animal vertebrado, selvagem ou doméstico; e antroponose, cujo hospedeiro é o Homem.

A doença é transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Lutzomyia* (Velho Mundo) ou *Phlebotomus* (Novo Mundo), designado por “mosquito palha”. Ainda que outros gêneros de mosquitos e hematófagos invertebrados, que não flebotomíneos, venham referenciados como possíveis vetores do parasita *Leishmania*, ainda não há evidências experimentais que suportem tais sugestões^{xxiii} [6].

Os flebótomos alimentam-se de carboidratos que ingerem das plantas, no entanto, as fêmeas necessitam das proteínas sanguíneas para o desenvolvimento dos ovos. Por este motivo, apenas a fêmea hematófaga transmite o parasita aos hospedeiros vertebrados. Os locais de repouso e de oviposição são zonas ricas em matéria orgânica^{xxiv} [37].

A diversidade de vetores permite uma ampla distribuição epidemiológica da doença^{xxv}[38], ocorrendo infecções provocadas pelo inseto vetor em todas as regiões intertropicais da América e África e em regiões temperadas da América do Sul e Europa e Ásia^{xxvi, xxvii} [39]. As diferentes espécies de flebótomos ostentam habitats distintos^{xxviii} [39].

Os hospedeiros vertebrados já reconhecidos pertencem à família Canidae. No caso de *Leishmania infantum*, o cão (*Canis familiaris* L. 1758) é o principal reservatório doméstico. A raposa, chagal e lobo têm funcionado como reservatórios silváticos.

1.2.3. Desenvolvimento de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado

O inseto vetor injeta saliva durante a picada que previne a coagulação do sangue do mamífero^{xxvii}. Após a ingestão do sangue, os promastigotas na forma metacíclica são libertados e entram na pele do hospedeiro por regurgitação (Fig. 4)^{xxviii}. Uma única picada liberta múltiplas substâncias que rapidamente induzem a infiltração de neutrófilos e recrutamento substancial de macrófagos para a pele. Os parasitas que se encontram na pele, invadem primeiro os neutrófilos e depois os macrófagos, sendo que outro tipo de células como por exemplo, células de Langerhans e fibroblastos, podem também ser infetadas^{xxix}.

Este primeiro passo da infecção envolve a internalização via fagocitose do parasita por fagossomas que são contíguos com a membrana plasmática externa do macrófago. O fagossoma altera-se por fusão com um lisossoma secundário, resultando num fagolisossoma ou vacúolo parasitário (VP)^{xxx}[22]. Este é um compartimento ácido, rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas^{xxxi} [23]. Assim, o parasita que inicialmente se encontra no meio extracelular, liga-se à superfície do macrófago e é internalizado pelo VP^{xxxii}[24].

Tudo indica que os neutrófilos desempenham um papel importante, atuando como modelos de “cavalos de Troia”. A captação de neutrófilos infectados é um mecanismo para a entrada “silenciosa” dos parasitas nos macrófagos ^{xxii [21]}, enquanto que os macrófagos são importantes para o estabelecimento final e amplificação da infecção.

Uma grande parte dos processos microbicidas dos macrófagos são alterados depois da infecção com *Leishmania* ^{xxv[24]}.

Quando o parasita é internalizado no vacúolo parasitário, o promastigota metacíclico transforma-se na sua forma amastigota, estágio não dotado de mobilidade, seguido da fusão de lisossomas da célula hospedeira com o VP ^{ix}.

No citoplasma da célula hospedeira o amastigota inicia um processo de proliferação, dividindo-se assexuadamente por fissão binária. Depois de uma intensa multiplicação, a membrana do macrófago rompe, libertando para o tecido os amastigotas (Fig. 4).

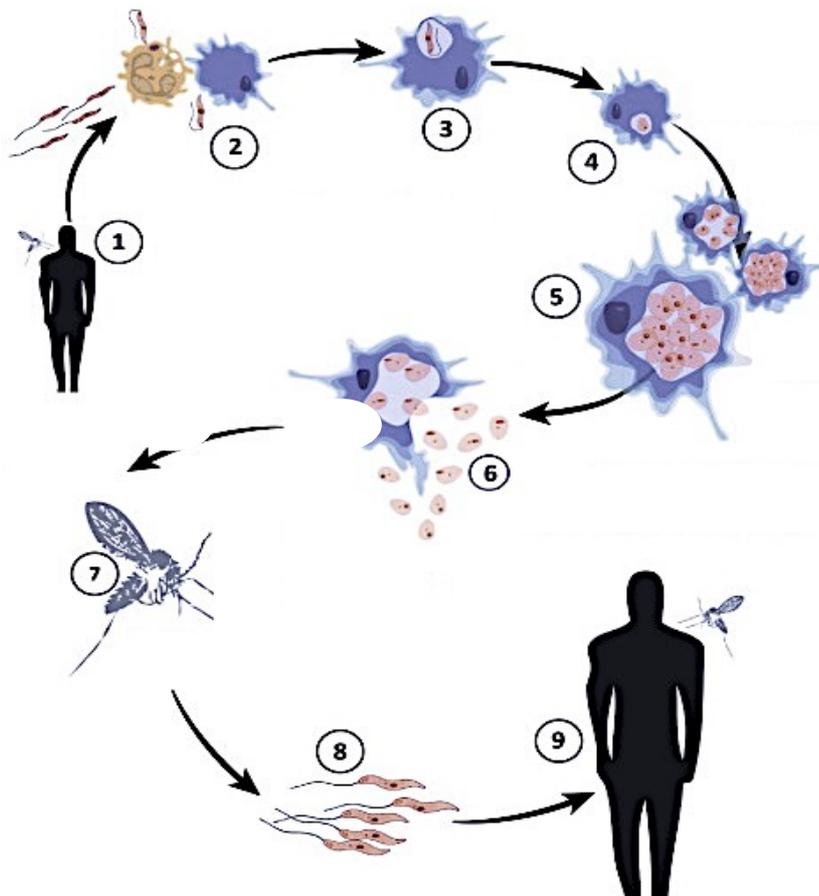


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania*. Transmissão dos promastigotas metacíclicos ao hospedeiro vertebrado (1); Deslocação de neutrófilos e macrófagos ao local da infecção (2); Fagocitose do parasita pelo macrófago (3); Transformação do promastigota em amastigota no VP (4); Replicação dos amastigotas por divisão simples (5); Libertação dos amastigotas como consequência da ruptura da membrana plasmática dos macrófagos (6); Ingestão de amastigotas infecciosos pelo mosquito vetor durante a sua refeição de sangue (7); que por sua vez liberta promastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo^[26]

Esta fase é crónica e pode continuar durante meses a anos ou até por toda a vida sem que apareçam sinais visíveis ou sintomas, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro e do seu sistema imunitário. Os amastigotas podem infectar macrófagos localizados na pele, dando origem à leishmaniose cutânea, podem disseminar para outros órgãos (concentrando-se no baço, fígado e medula óssea), como na leishmaniose visceral, ou disseminar para a mucosa originando a leishmaniose mucocutânea^{xxxiii, xxxiv}.

1.2.4. Desenvolvimento de *Leishmania* no hospedeiro invertebrado

Como já referido, o hospedeiro invertebrado é infectado quando se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infetado.

O inseto fêmea usa peças bucais para perfurar a pele do mamífero, lacerando capilares e formando hemorragias, que iniciam uma forte resposta inflamatória no local. O flebótomo ingere sangue contaminado por macrófagos infetados com amastigotas, o sangue é imediatamente digerido no intestino médio abdominal do invertebrado, e os amastigotas são anexados à matriz peritrófica (MP) (Fig. 5).^{xxii, xxxv 27]}

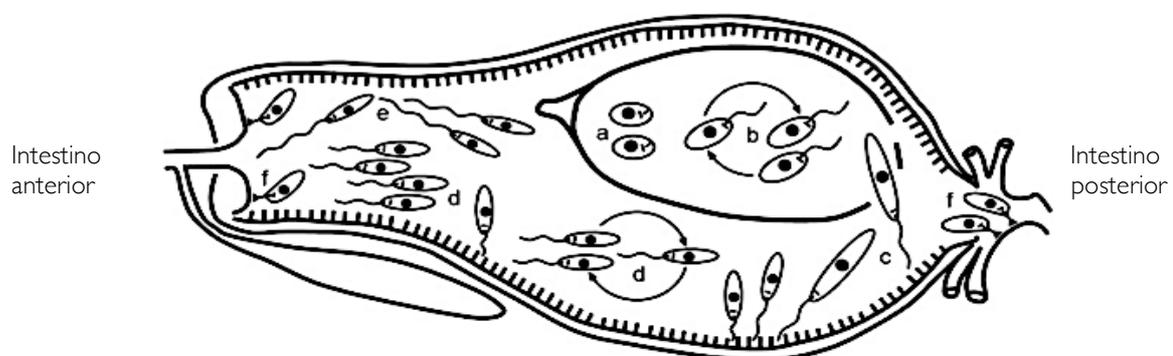


Figura 5: Desenvolvimento de *Leishmania* no trato digestivo do vetor. Depois de ingeridos, os amastigotas dirigem-se e fixam-se no intestino médio abdominal, mais especificamente na matriz peritrófica (MP) (a). Aqui transformam-se em promastigotas pró-cíclicas (b) que se replicam e passam a denominar-se nectomonas (c). A MP rompe devido às enzimas presentes no estômago e os longos nectomonas escapam através da abertura posterior e aderem às microvilosidades do intestino médio do epitélio. Logo se replicam em nectomonas mais pequenos de nome leptomonas (d) e transformam-se em promastigotas metacíclicas infecciosas (e) ou se fixam ao revestimento de quitina da válvula estomacal como haptomonados (f). A secreção do gel secretor dos promastigotas, juntamente com a obstrução da válvula, facilita o refluxo de parasitas metacíclicos quando o mosquito de palha faz a sua refeição de sangue^[36]. Dostálová A., Volf P., *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interaction overview. BioMed Central (2012) 5:276.

Esta estrutura rodeia a refeição de sangue e atua como uma barreira de proteção contra a difusão das enzimas digestivas, limitando a exposição do parasita ainda numa fase inicial da infecção em que estão demasiado vulneráveis à proteólise, promovendo a sobrevivência dos parasitas ^{xxxvi, xxxvii [28,29]}.

Os amastigotas entram numa fase proliferativa e passam a denominar-se promastigotas procíclicos. A principal função destes é a replicação e estabelecer a infecção inicial. Durante esta transformação, formas intermediárias entre amastigotas e promastigotas são mais susceptíveis à morte pelas enzimas digestivas, tripsina nomeadamente, que se encontram no intestino ^{xxix, xxxviii 31]}.

Subsequentemente, a porção anterior da MP rompe e os parasitas aí acumulados são libertados no intestino médio do epitélio do inseto. Nesta fase de diferenciação, a presença de lipofosfoglicano (LPG), molécula dominante na superfície dos promastigotas de *Leishmania*, permite a adesão dos parasitas, pela região flagelo, ao intestino médio do epitélio. Quando os parasitas, agora promastigotas nectomonas, se separam das paredes do epitélio, migram através da válvula estomacal localizada no intestino médio anterior, onde se concentram e iniciam divisão celular ^{xxxix, xl [32, 33]}.

Os promastigotas nectomonas são a primeira forma a colonizar o estômago médio anterior e são os precursores dos promastigotas leptomonas cujas principais funções são a produção e secreção do gel secretor dos promastigotas (GSP), que atua obstruindo a faringe e intestino médio e originar os promastigotas metacíclicos ^{xxxi, xli 34]}.

Com a produção do GSP, os parasitas são estimulados a iniciar a metaciclogénese em que passam à sua forma metacíclica e infecciosa, que durante a picada do inseto, é libertada infetando novos hospedeiros vertebrados, dando origem a um novo ciclo ^{xlii [35]}.

1.3. Manifestações clínicas da leishmaniose

As manifestações clínicas da Leishmaniose dependem de interações complexas entre a resposta imunológica de determinado mamífero e das características de virulência da espécie infetiva de *Leishmania* spp. ^{xliii [41]}.

A leishmaniose pode expressar-se clinicamente de várias formas, de entre as quais se destacam três, a leishmaniose visceral (LV), a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (Fig. 6). Outros tipos de manifestações cutâneas, ainda que mais raros, são a leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose recidivante (LR) e leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LDPK).

1.3.1. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma importante causa de morbidez e mortalidade na Índia, África, América latina e no litoral do Mediterrâneo.

Em termos clínicos é caracterizada por acessos irregulares de febre, perda de peso e anemia. A LV produz edema nos órgãos (Fig. 6A), principalmente o fígado e baço e se não tratada devidamente pode levar à morte^{xiii}. A LV é altamente endêmica no subcontinente Indiano e na África oriental, estimando-se entre 200 000 a 400 000 novos casos por ano, de entre os quais 90% ocorrem em Bangladesh, Etiópia, Brasil e Sudão e causa 20 000 mortes por ano^{xxxvi}.

Em adultos já infetados com VIH, a leishmaniose visceral apresenta características clínicas atípicas resultando numa infeção oportunista com elevada taxa de recaídas e mortalidadeⁱⁱ.

As espécies de parasitas *L. (L.) donovani* (na Índia, África e Ásia), *L. (L.) infantum* (bacia do Mediterrâneo) e *L. (L.) chagasi* (América do sul) são responsáveis pela LV.

1.3.2. Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação da infeção por *Leishmania* mais comum. Apesar de não estar tão associada a mortalidade, as lesões cutâneas (Fig. 6B), eritemas, edemas ou úlceras, são geralmente crónicas e desfigurantes^{xiii}. Tipicamente forma-se um nódulo na pele, no local onde foram inoculados os promastigotas e com o tempo origina uma úlcera. As lesões podem persistir durante meses ou anos, mas que normalmente progridem para a cura, deixando uma cicatriz atrofiada.

Nos últimos 5 anos foram reportados 1 milhão de casos de LC. Cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, no Oriente médio e África central.

Os agentes etiológicos responsáveis por este tipo de leishmaniose são no Novo Mundo *L. (L.) panamensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) peruviana* e *L. (L.) guyanensis* e no Velho Mundo, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. A *L. donovani* é ocasionalmente responsável por produzir, após a resolução da leishmaniose visceral, lesões na pele, condição esta conhecida como leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LDPK).

1.3.3. Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea, ou leishmaniose tegumentar, afeta as áreas do nariz, faringe, lábios, ou face em geral, resultando em desfiguração (Fig. 6C), e morbidade em áreas endémicas

da América latina, sendo que aproximadamente 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru.

A espécie de parasita responsável pela leishmaniose mucocutânea é *L. (V.) braziliensis*.

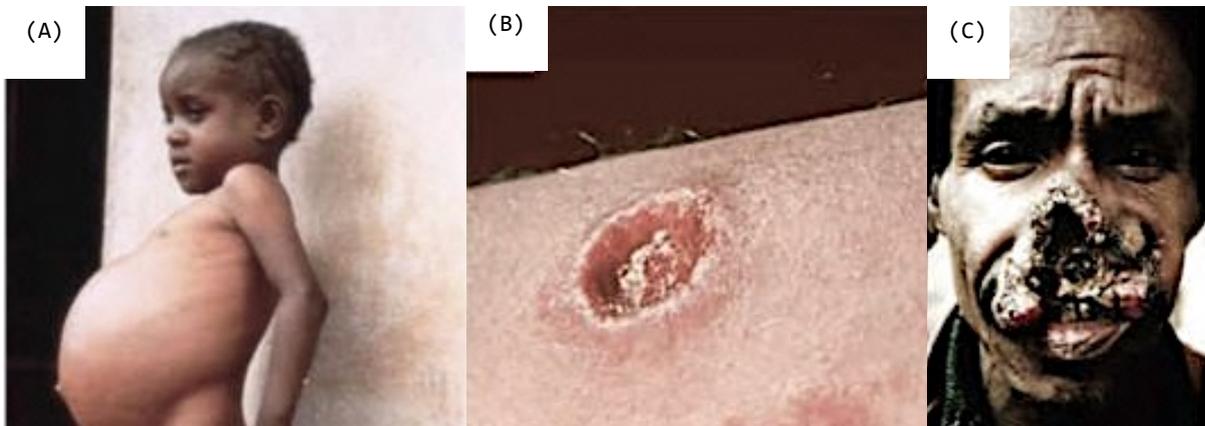


Figura 6: Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose visceral; (B) Leishmaniose cutânea; (C) Leishmaniose mucocutânea. (Adaptado de <http://web.stanford.edu/class/humbio153/ImmuneEvasion/>)

I.4. Epidemiologia

A leishmaniose pode ser encontrada em focos de infecção em mais de 90 países nos trópicos, subtropicos e no sul da Europa (Fig. 7). A zona ecológica varia desde florestas tropicais até aos desertos africanos, tendo uma maior incidência nas zonas rurais, apesar de em áreas urbanas também terem sido identificados alguns focos.

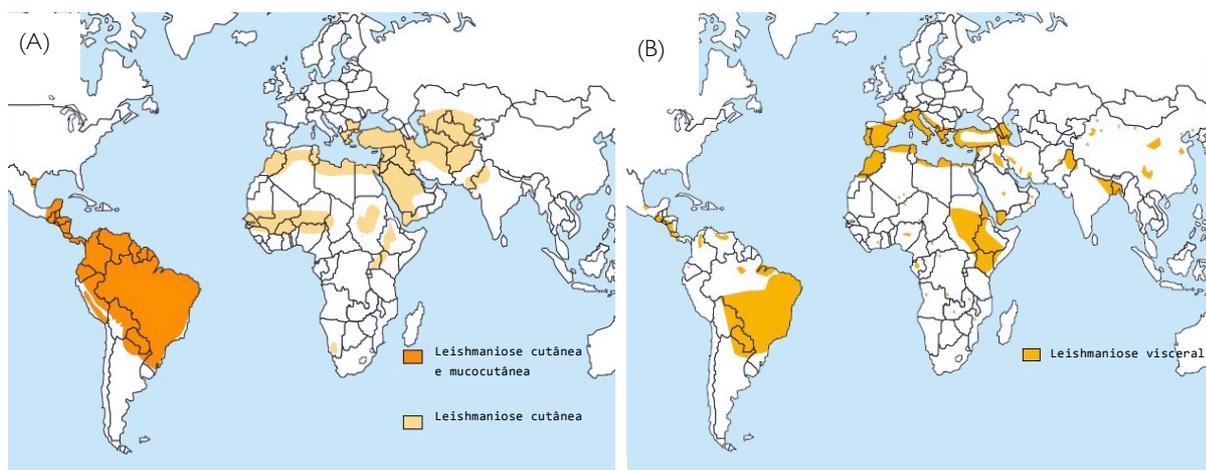


Figura 7: Distribuição geográfica das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea e mucocutânea; (B) Leishmaniose visceral. (Adaptado de <http://www.ndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>)

A doença é causada por 20 espécies patogénicas para o Homem através da picada de minúsculos insetos dípteros, os flebótomos. Este inseto-vector pode ser encontrado desde a zona intertropical até às regiões temperadas.

Assim, a epidemiologia das leishmanioses depende de uma série de características, nomeadamente a espécie do parasita, as características ecológicas do local de transmissão e a exposição prévia da população ao parasita.

O número de casos por ano varia dependendo do tipo de manifestação clínica da leishmaniose. Segundo dados da OMS 2010 os números de incidência da leishmaniose cutânea variam entre os 700 mil e 1.2 milhões de casos enquanto que a visceral varia entre os 200 e os 400 mil novos casos.

Nos últimos anos novos casos de leishmaniose têm vindo a aumentar, o que muito se deve a melhorias nas técnicas de diagnóstico, aumento nos fatores de risco, tais como alterações climatéricas e ambientais, migração, desflorestação, alterações na suscetibilidade do hospedeiro e desenvolvimento de resistência ao tratamento ^{xxxvii}.

A leishmaniose pode ser transmitida através de partilha de seringas entre toxicod dependentes, por transfusão de sangue e por via congénita. No entanto, estes modos de transmissão são mais raros que a transmissão através de vetores biológicos.

Em Portugal a prevalência da leishmaniose visceral é baixa, em contraste com a leishmaniose canina, sendo diagnosticados cerca de 15 novos casos por ano.

Ainda que a leishmaniose cutânea não seja tão conhecida em Portugal, não deve ser considerada uma doença rara, uma vez que são diagnosticados 10 novos casos por ano.

1.5. Desenvolvimento de vacinas

Evidências de que maioria dos indivíduos infetados com leishmaniose eram resistentes a infeções clínicas subsequentes, constituiu a base para o desenvolvimento da primeira vacina contra a leishmaniose^[58].

Após estabelecidas as técnicas axénicas para cultura de promastigotas de *Leishmania*, foram realizadas infeções controladas em diversos países que resultaram na proteção significativa de reinfeção^[59]. Uma primeira geração de candidatos a vacina consistia em parasitas mortos ou extratos, com os quais não se obtiveram resultados conclusivos. Numa segunda geração procedeu-se à recombinação de proteínas e vacinas genéticas, mas não resultaram em alternativas clínicas relevantes.

Contudo, vários têm sido os problemas associados ao uso de vacinação, como por exemplo,

lesões cutâneas descontroladas e imunossupressão ^[60].

Por várias razões, como dificuldades na manutenção da virulência do parasita e o risco de lesões inaceitáveis em diversos receptores, a vacinação não é ainda correntemente recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

I.6. Tratamento

Vários são os fatores de risco envolvidos na propagação da leishmaniose pelo mundo. A falha no tratamento e resistência aos fármacos são fatores cruciais na incapacidade de travar o aumento de uma doença ^[6].

Considerando o cenário atual, o desenvolvimento e descoberta de novos compostos antileishmaniais são de facto imprescindíveis.

Depois de confirmada a infecção no doente, a extensão da infecção deve ser determinada de forma a escolher a terapia ou tratamento a aplicar, seguindo as *guidelines* nacionais ou regionais, quando aplicáveis.

A política de farmacos em países endémicos e as decisões terapêuticas devem ter como base a relação benefício-risco individual dos medicamentos, a disponibilidade dos medicamentos leishmanicidas e considerações de saúde pública como a prevenção da resistência aos medicamentos^[6].

Na ausência de uma vacina eficaz, a quimioterapia continua a ser a arma mais eficaz no arsenal terapêutico contra a leishmaniose e os principais fármacos disponíveis são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a miltefosina, pentamidina e paramomicina.

Abordagens recentes englobam a pesquisa de compostos derivados de produtos naturais como plantas e desenvolvimento de formulações tópicas, mais direcionadas para a leishmaniose cutânea.

I.6.1. Quimioterapia parental

I.6.1.1. Antimoniais pentavalentes

O regime de tratamento usado contra a leishmaniose era baseado, primeiramente, em antimoniais pentavalentes como o estibogluconato de sódio (SSG) (Pentostam[®]) (Fig. 8), e a meglumina antimonial, (Glucantime[®]). Antimoniais são quelatos não-covalentes do Sb(V) com solubilidade e internalização melhorada^[42].

Estes fármacos são ainda a primeira linha no tratamento na LV e LC nos países de África, América do sul, Bangladesh, Nepal e Índia (excepto no norte de Bihar).

Ainda que o seu uso dure há mais de 60 anos, a utilização deste tipo de moléculas tem sido limitada devido aos graves efeitos secundários de alto risco, custo elevado, eficácia muito variada para a mesma dose de tratamento e resistência ao fármaco aquando de tratamentos prolongados.

1.6.1.2. Anfotericina B

A anfotericina B (AmB) (Fungizone®) (Fig. 9) é um polieno macrólido com atividade antifúngica, que foi descoberto a partir da bactéria *Streptomyces*. De forma geral, é recomendado na terapia de segunda linha contra todas as formas de leishmaniose. Para o tratamento da LV em áreas com resistência a antimoniais, onde não existem outras opções disponíveis é mesmo considerado o fármaco de eleição [44, 45, 46].

A atividade leishmanicida da AmB deve-se à sua seletividade para formar ligações a 24 esteróis substituídos, nomeadamente a uma fração do ergosterol da membrana celular do parasita, aumentando assim a sua permeabilidade bem como a sua seletividade para o microrganismo [47].

Contudo, a AmB está associada a diversos efeitos secundários incluindo febre, tromboflebite, toxicidade como miocardite e hipocalcemia severa [48]. Para além disso, é um fármaco de elevado custo e requer semanas de hospitalização com monitorização clínica e laboratorial intensiva [49].

Atualmente, os efeitos adversos da AmB têm sido minimizados através da substituição do veículo de administração nomeadamente com o avanço das formulações lipídicas, Ambisome®, Fungisome®, Amphocil®, Abelect®, resultando no aumento de eficácia e toxicidade reduzida quando comparado com a formulação do fármaco-mãe [50]. O período de tratamento também é bastante mais reduzido (5 dias) [49].

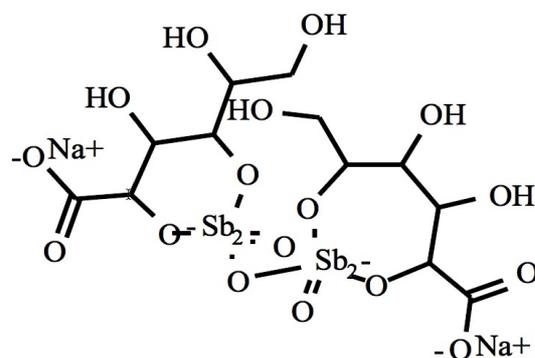


Figura 8: Estrutura química do Estibogluconato de sódio [43].

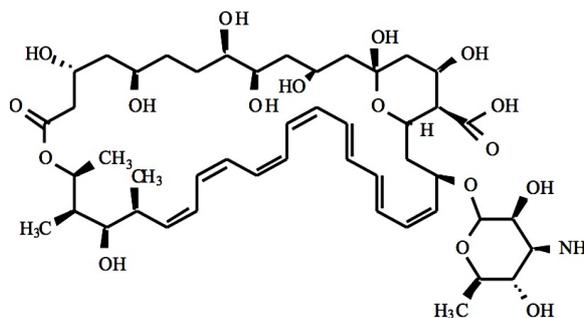


Figura 9: Estrutura química da Anfotericina B [42].

A resistência clínica à anfotericina B é rara. Não obstante, com o aumento do uso da anfotericina B, especialmente nas formulações lipídicas que têm um tempo de meia vida mais longo, pode haver a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao fármaco^[44].

1.6.1.3. Pentamidina

A pentamidina (Pentacarinato®) é um derivado aromático da diamidina (Fig. 10), originalmente sintetizada como uma droga hipoglicêmica e que mais tarde veio a demonstrar atividade contra *Leishmania*, particularmente em infecções do tipo visceral. É administrada via intramuscular ou, preferencialmente, intravenosa.

A pentamidina atua no ADN do parasita, alterando a replicação e transcrição a nível mitocondrial^[48].

O tratamento com este fármaco causa dor no local da injeção, náuseas, dor de cabeça, sensação de queimadura, hipotensão, disfunção renal, entre outros^[55].

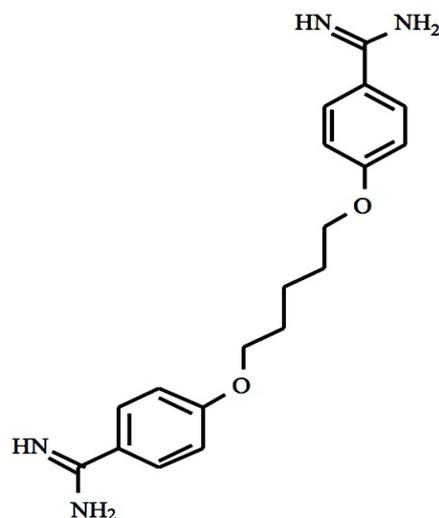


Figura 10: Estrutura química da Pentamidina^[42].

1.6.1.4. Paramomicina

A paramomicina (Humatina®) (Fig. 11) é um antibiótico aminoglicosídeo produzido pelo *Streptomyces rimosus*. Para além de ter mostrado eficácia contra várias bactérias, protozoários e *Leishmania spp*, é também uma formulação parenteral de baixo custo^[56].

A sua administração ocorre via intramuscular e tudo indica que o mecanismo de ação esteja associado com a inibição da síntese de proteínas mediante a ligação da subunidade 30S ribossomal ao codão inicial do mARN, levando a acumulação anormal do complexo de iniciação.

Os efeitos secundários associados são a ototoxicidade, disfunção do fígado, erupções cutâneas e pruridos locais.

Uma vez que a toxicidade e a resistência são os principais inconvenientes dos fármacos antileishmanicidas usados atualmente, estudos estão a ser direcionados para a terapêutica combinada. A

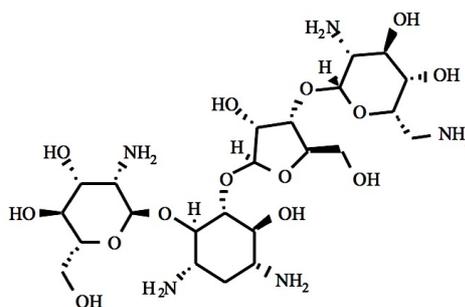


Figura 11: Estrutura química da Paramomicina^[42].

combinação de fármacos proporciona a diminuição não só o tempo de tratamento, mas também da dose total e conseqüentemente redução da toxicidade e dos custos. Esta abordagem reduz, também, a probabilidade de seleção de parasitas resistentes, prolongando desta forma o tempo de vida eficaz dos medicamentos ^[57, 45].

1.6.2. Quimioterapia oral

1.6.2.1. Miltefosina

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Impávido® e Miltex®) é um fosfolípido alquílico, desenvolvido como um agente antineoplásico ^[51]. Foi o primeiro agente oral a ser aprovado para o tratamento da leishmaniose visceral. Quando tomadas as doses recomendadas, são eficazes em 94% dos casos de LV ^[52].

O mecanismo de ação antileishmanial da miltefosina pode ser extrapolado a partir dos efeitos que causa nas células de mamíferos: modulação dos receptores à superfície das células, ativação de fosfolipases e proteínas cinase C e outras vias mitogénicas, em apoptose ^[53].

Contudo, a miltefosina tem um custo elevado e está associada a efeitos adversos gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), toxicidade renal, potencial teratogénico e apresenta tempo de meia vida longo (~1 semana), o que o torna um medicamento vulnerável a resistência ^[54].

1.6.3. Formulações tópicas

Os tratamentos tópicos são uma alternativa atrativa e recomendada para as formas localizadas e auto-limitantes da doença LC. Para além disso, oferece vantagens significantes como a administração, facilidade no cumprimento do tratamento por parte do doente, menos efeitos adversos e baixo custo em relação à terapêutica sistémica.

A combinação de sulfato de paramomicina e cloreto de metil benzetónio em pomada de parafina tem mostrado resultados favoráveis em ratos BALB/c infectados com *L. major* e *L. mexicana*, terem vindo a ser resultados favoráveis. Outras formulações tópicas já foram testadas em ensaios clínicos, mas os resultados não foram promissores.

Estudos têm vindo a ser concebidos de forma a investigar outros tratamentos tópicos para a leishmaniose, incluindo a quinacrina, miconazol, clotrimazol, clorpromazina e anfotericina ^[45].

1.6.5. Produtos naturais derivados de plantas

As plantas são conhecidas por produzir uma variedade de metabolitos ativos que têm vindo a ser usados como tratamento, entre outros casos, de doenças crónicas. Os mecanismos de ação molecular destas moléculas bioativas, têm vindo a abrir novos caminhos à comunidade científica no âmbito da descoberta e desenvolvimento de novas e melhores abordagens terapêuticas para combater variadíssimas doenças^[61].

As plantas são, de forma geral, uma importante fonte de candidatos farmacológicos, mas particularmente contra os parasitas devido à sua longa associação. Centenas de plantas já mostraram ter atividade contra várias formas de parasitas. Estudos iniciais de atividade de produtos vegetais deram lugar a uma era de química orgânica que levou ao desenvolvimento de compostos antiprotozoários^[45].

Entre as classes de compostos que têm apresentado resultados favoráveis, de referenciar as quinonas, flavonoides, alcaloides e terpenos.

1.6.5.1. Ácido ursólico e derivados

O ácido ursólico (AU) ou 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic-acid, é um composto triterpenóide pentacíclico (Fig. 12), cuja fórmula molecular é C₃₀H₄₈O₃ e possui como isómero o ácido oleanólico (AO).

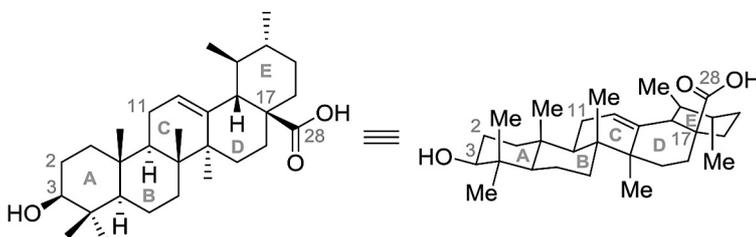


Figura 12: Estrutura química do Ácido Ursólico^[66].

Na natureza encontra-se como ácido livre ou como aglicona de saponinas (ligados a cadeias de açúcar, oses, denominando-se de saponinas). O AU já foi isolado a partir de mais de 120 espécies de variadas classes de plantas medicinais, como *Eriobotrya japonica* (nespereira), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Hedyotis diffusa* (erva chinesa), *Ligustrum lucidum* (ligustro, árvore chinesa) *Glechoma hederaceae* (planta com flor, erva-de-são-joão, presente no território português), *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-de-urso), *Vaccinium macrocarpon* (arando), *Rhododendron hymenanthes Makino*, *Calluna vulgaris* (arbusto Queiró), *Ocimum sanctum* (tipo manjeriço), *Eugenia jambolana* (azeitona preta) e na casca de algumas frutas como a maçã, pêra e ameixa.

O ácido ursólico tem uso consagrado na cosmética devido à sua ação antioxidante e renovador celular, no entanto, o seu potencial farmacológico tem vindo a ser esclarecido ao longo dos últimos anos, tendo já sido reportada a sua capacidade para modular uma variedade

de vias de sinalização associadas à progressão do cancro, bem como de lesões cardiovasculares e neurológicas, atividade hepatoprotetora, atividade antidiabética, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana [62, 63, 64, 65].

A atividade antileishmanicida do ácido ursólico já foi avaliada e demonstrada *in vitro* e em modelos animais [66, 67, 68].

Apesar da ampla gama de atividades farmacológicas atribuídas ao ácido ursólico, a solubilidade aquosa baixa pode limitar a biodisponibilidade e conseqüentemente o seu uso^[69].

Mais recentemente os estudos optam por sintetizar derivados do AU, fazendo modificações químicas na sua estrutura, como alteração de alguns grupos funcionais, de forma a melhorar o potencial terapêutico e a dose ativa, ou seja, o seu potencial farmacológico^[61].

Em sumário, os fármacos leishmanicidas disponíveis atualmente apresentam sérias desvantagens no que toca a segurança, resistência, estabilidade e custos. Têm baixa tolerabilidade, duração de tratamento longo e são difíceis de administrar.

Dadas as vantagens do uso de combinação de fármacos e o risco de desenvolver resistência aos medicamentos novos ou já estabelecidos, o uso da monoterapia deve ser limitado à anfotericina B lipossomal, sempre que possível.

A procura de novas moléculas incide em compostos orais ou tópicos toleráveis, eficazes, de baixo custo, menos tóxicos, facilmente acessíveis e ao alcance das pessoas mais carentes e afetadas pela leishmaniose. Entre as várias opções, são os produtos derivados de plantas os mais facilmente disponíveis e relativamente baratos^[45].

Capítulo I I

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo encontrar compostos ativos ou protótipos úteis para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para a leishmaniose.

A partir deste objetivo geral, foi desenvolvido um plano de trabalhos com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de 19 derivados triterpenóide do ácido ursólico em promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos mais ativos em amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos mais ativos em macrófagos de mamíferos e determinar a sua especificidade;
- Caracterizar a atividade anti-*Leishmania* do composto derivado do ácido ursólico mais ativo no que diz respeito aos potenciais mecanismos envolvidos, avaliando o seu efeito sobre o ciclo celular, apoptose/necrose, níveis de Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio e morfologia.

Capítulo III

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Compostos

Os compostos avaliados no presente trabalho foram derivados triterpenóide do ácido ursólico, previamente sintetizados no Grupo do Professor Jorge António Ribeiro Salvador no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, como parte integrante de uma larga biblioteca de composto para avaliação biológica.

As soluções stock foram preparados em dimetilsufóxido (DMSO) a uma concentração de 10 mM e armazenadas a -20°C.

3.2. Estudos de susceptibilidade

3.2.1. Origem e cultura de *Leishmania*

Os promastigotas de *L. infantum Nicolle* (zimodemo MON-1) foram cultivados a 26°C em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (7,5% w/v), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado.

O crescimento foi monitorizado, por observação das culturas ao microscópio invertido, atendendo às características morfológicas, mobilidade e número de promastigotas. As passagens foram realizadas semanalmente.

3.2.2. Estudos de viabilidade celular em promastigotas

A viabilidade celular dos promastigotas foi avaliada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)^{xliv}. Este método tem como princípio a redução do sal tetrazolium MTT, um substrato amarelo, por enzimas mitocondriais. Esta redução resulta num produto azul/roxo denominado formazana que pode ser quantificado por

espectrofotometria. A reação de redução só ocorre em células vivas, cujas mitocôndrias se encontrem ativas, permitindo assim a quantificação da viabilidade celular.

A partir das soluções stock dos compostos, foram preparadas soluções extemporâneas de trabalho em meio RPMI-1640. Paralelamente, foram também preparadas soluções em RPMI-1640 de ácido ursólico (controlo positivo de atividade).

As soluções de trabalho foram distribuídas por placas de cultura de 96 poços em concentrações crescentes, 5, 20, 50, 100 e 200 μM . Posteriormente, foi adicionado meio RPMI-1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% de SBF inativo e por fim os promastigotas de *L. infantum* em fase de crescimento logarítmica (2×10^6 células/mL). Os controlos de solventes e de atividade foram realizados ao mesmo tempo e sob as mesmas condições.

As placas foram incubadas a 26°C durante 24 horas e após este período, adicionou-se 25 μL de MTT a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C durante 2 horas.

Posteriormente, as placas foram sujeitas a centrifugação a 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Obtidos os sedimentos com os parasitas, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais de formazana foram dissolvidos em 250 μL de DMSO. A leitura da absorvância foi feita a 530 nm num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK)^{xlv}.

A viabilidade celular foi calculada através da seguinte equação: $\frac{A_{\text{tratado}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100$,

onde A_{tratado} representa a absorvância lida das células sujeitas ao composto e A_{controlo} a absorvância lida das células controlo (sem composto, com o veículo de dissolução). Os resultados foram expressos em percentagem de absorvância em relação ao controlo. A concentração inibitória da viabilidade dos parasitas *Leishmania infantum* a 50% (CI_{50}) foi determinada através da regressão dose-resposta, extrapolada pelo programa GraphPad Prism 6.

3.2.3. Estudo de interação parasita-hospedeiro

O ciclo de vida de *Leishmania sp.* requer a passagem do parasita por dois hospedeiros, o vetor invertebrado (mosquito de areia) e um hospedeiro vertebrado. A transformação da forma promastigota em amastigota ocorre no hospedeiro vertebrado após fagocitose por macrófagos deste último e é a forma que se replica no hospedeiro vertebrado e provoca a doença. Assim, o estudo dos efeitos anti-*Leishmania* de um composto deve ser também realizado na forma amastigota intracelular.

Macrófagos peritoneais foram isolados de murganhos BALB/c com idades entre as 4 e 6 semanas e com peso entre os 20 e 25g. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após serem anestesiados. Posteriormente à occisão dos murganhos, os macrófagos foram retirados com auxílio de uma seringa e procedeu-se à contagem de células na câmara de Neubauer. Posteriormente, 5×10^5 células/mL foram inoculadas em placas de cultura de 24 poços, contendo lamelas redondas e meio RPMI enriquecido com 10% de FBS, e incubou-se a 37°C durante 2 horas em atmosfera com 5% de CO_2 .

Terminado este período de aderência dos macrófagos, o meio foi rejeitado e adicionaram-se os promastigotas de *Leishmania infantum* ($3,5 \times 10^6$ células/mL) em fase estacionária de crescimento. Para promover a fagocitose do parasita por parte do macrófago, as placas de cultura foram incubadas a 34°C durante 4 horas. Os parasitas não fagocitados foram removidos e adicionou-se o composto triterpenóide mais ativo, na concentração CI_{50} . As placas de cultura com os macrófagos infetados foram incubadas durante 24 horas a 34°C em atmosfera com 5% de CO_2 .

Após o tratamento, as lamelas com os macrófagos infetados foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa (10% PBS) e montadas em lâminas^{xvii}.

A percentagem de macrófagos infetados foi determinada por contagem ao microscópio óptico com objetiva de 100x (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, I65 DN100 Nikon), num total de pelo menos 200 células. O número de parasitas foi obtido pelo cálculo do índice de sobrevivência, segundo a equação $\frac{\% \text{células infetadas} \times n^\circ \text{ amastigotas}}{n^\circ \text{ Total macrofagos}}$, que foi utilizado para determinar o IC_{50} , por análise de regressão linear^{xviii}.

3.3. Estudo de citotoxicidade em células animais

As células de macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio Earle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) e incubadas a 37°C e em atmosfera com 5% de CO_2 . Atingida a confluência da monocamada de células, rejeitou-se o meio e adicionou-se meio fresco.

As células foram então incubadas na presença dos compostos triterpenóides mais ativos, na concentração CI_{50} , durante 24 horas a 37°C e em atmosfera com 5% de CO_2 .

Decorrido este período, as monocamadas foram lavadas em PBS (pH 7,2) e a cada poço foi adicionado 90 μL de PBS e 10 μL de MTT (5 mg/mL). Após o período de incubação de 1 hora

a 37°C, rejeitou-se o sobrenadante e depois das células serem lavadas em PBS, adicionou-se 100 µL de DMSO para dissolver a formazana ^{xiii}.

A absorvância a 530 nm foi determinada num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK) e a viabilidade celular foi calculada pela equação: $\frac{A_{\text{tratado}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$, onde A_{tratado} representa a absorvância das células sujeitas ao composto e A_{controle} a absorvância das células controlo.

O índice de seletividade foi determinado através da razão entre a CC_{50} em macrófagos RAW 264.7 e a CI_{50} obtida para as formas promastigotas ou amastigotas de *L. infantum*.

3.4. Estudo morfológico por microscopia óptica

O estudo morfológico foi realizado de forma a estudar os efeitos do composto triterpenóide mais ativo na morfologia dos promastigotas de *L. infantum*. Recorreu-se à microscopia de contraste de fase e à microscopia de fase normal após coloração de Giemsa.

Os promastigotas em fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram tratados com o composto triterpenóide mais ativo na concentração IC_{50} e incubados a 26°C durante 24h, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) e enriquecido com 10% SBF inativado.

Decorrido o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em meio fresco. Cerca de 10 µL de suspensão de promastigotas foram colocados na lâmina de Koch e observou-se diretamente ao microscópio óptico de contraste de fases (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, I65 DNI00 Nikon).

Paralelamente, realizaram-se esfregaços que foram fixados com metanol durante 5 minutos e corados com solução aquosa de Giemsa (1/10 v/v) por 10 minutos à temperatura ambiente. Por fim, os esfregaços foram lavados com água e secos à temperatura ambiente. A observação foi realizada ao microscópio com objetiva de 100x (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, I65 DNI00 Nikon).

3.5. Determinação dos níveis intracelulares de Ca^{2+}

A concentração intracelular de Ca^{2+} livre nas células foi medida recorrendo ao uso da sonda fluorescente, éster fluo-4 acetoximetil (Fluo-4/AM), específica para o íão Ca^{2+} . O Fluo-4/AM é um éster que exhibe um aumento na fluorescência (devido aos substituintes de flúor) quando se liga ao Ca^{2+} intracelular ^{xlvii}.

Os parasitas em fase logarítmica (1×10^7 células/mL) foram lavados e ressuspensos em PBS e marcados com a sonda Fluo-4/AM (5 μM) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a marcação, os parasitas foram novamente lavados e ressuspensos em PBS e distribuídos em uma placa de cultura de 96 poços de fundo preto. O composto triterpenóide mais ativo à concentração IC_{50} foi adicionado e o H_2O_2 (8mM) foi usado como controlo positivo, uma vez que induz a libertação de Ca^{2+} .

A leitura de fluorescência foi realizada em intervalos de dez minutos no leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK) a 495 nm de excitação e 506 nm de emissão.

A concentração de Ca^{2+} livre foi calculada com recurso à fórmula $[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F - F_{\text{MIN}}}{F_{\text{MAX}} - F}$ onde K_d é 345 nM, F indica a intensidade de fluorescência das células, F_{MIN} é o mínimo de fluorescência das células obtidas do tratamento com EGTA e F_{MAX} é a fluorescência máxima para as células tratadas com CaCl_2 (80 μM) ^{xlviii}.

3.6. Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigénio

Os níveis de espécies reativas de oxigénio foram determinadas recorrendo ao diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA), utilizado como marcador de espécies reativas de oxigénio (ROS) em células, incluindo oxigénio singlete, superóxidos, radicais hidroxilos e vários peróxidos e hidroperóxidos.

O H_2DCFDA difunde passivamente nas células, é clivado por esterases e retido intracelularmente. O H_2DCFDA , não fluorescente, é então oxidado pelas ROS e convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), muito fluorescente ^{xlii, xlix}.

De forma a detetar a produção endógena de espécies reativas de oxigénio, os parasitas na fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram tratados com o composto triterpenóide mais ativo na concentração IC_{50} e incubados durante 24 horas a 26°C. Paralelamente foi realizado o controlo positivo (0,25 mM H_2O_2). As células foram lavadas com PBS e posteriormente foram incubadas

por mais 45 min com o marcador H₂DCFDA, à temperatura ambiente e protegidas da luz. A emissão de fluorescência foi analisada a 528 nm (excitação a 485 nm), no leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK).

3.7. Citometria

A citometria de fluxo é uma técnica para análises simultâneas do tamanho, granularidade e múltiplas propriedades fluorescentes de células. Marcações específicas com anticorpos fluorescentes ou outros métodos de marcação fluorescente permitem uma visualização das propriedades imunológicas, bioquímicas e funcionais de células individuais em suspensões heterogêneas de células.

A análise por citometria de fluxo é baseada na medição da dispersão de luz e nos parâmetros de fluorescência quando um fluxo linear de células passa por um feixe de laser em ângulo direito (Fig.13). As células são canalizadas hidrodinamicamente e passam o foco do feixe de laser a uma taxa de 200-2000 eventos por segundo. Quando o feixe de laser incide sobre uma partícula, a luz que a atravessa é detetada por um sensor que se encontra em linha com o laser, o FSC, e o sinal recolhido por este sensor está relacionado com o tamanho da célula. Por outro lado, a luz que é desviada pela partícula é detetada por outro sensor, SSC, que se encontra perpendicular ao feixe de laser. Células coradas emitem um sinal de fluorescência que é canalizado por filtros que permitem selecionar diferentes comprimentos de onda de emissão de fluorescência a ser detetada (FL-1, FL-2, FL-3)¹.

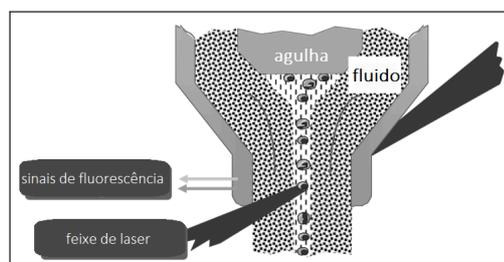


Figura 13: Esquema representativo da passagem de células em fluxo no citómetro de fluxo. (Adaptado de www.isac-net.org)

3.7.1. Estudo do ciclo celular

A citometria de fluxo permite identificar a distribuição de células durante as várias fases do ciclo celular. Quatro fases podem ser reconhecidas numa população de células em proliferação: fase G₁, a fase S que corresponde à fase de síntese do ADN, a fase G₂ e a fase M, fase que

corresponde à mitose. As fase G_2 e M, por apresentarem o conteúdo de ADN idêntico, não são discriminadas. As células são marcadas com um corante que se liga ao ADN, como por exemplo o iodeto de propídio (IP), que quando excitado a 488 nm emite fluorescência vermelha com determinada intensidade, sendo esta proporcional à quantidade de ADN presente. O software determina assim as percentagens de células que se distribuem pelas diferentes fases do ciclo celular ^{li}.

Os promastigotas em fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram incubados na presença do composto mais ativo à concentração Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, a 26°C, durante 24 horas. Os controlos do veículo de dissolução realizaram-se sob as mesmas condições, sem composto e na presença de DMSO em concentrações iguais às presentes nos ensaios com os compostos. O controlo de ciclo celular foi realizado contendo apenas os promastigotas e meio de crescimento.

Após a incubação, os parasitas foram lavados em PBS e ressuspensos em PBS contendo digitonina, iodeto de propídio e RNase, e incubados por 45 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Por último procedeu-se à análise de 10000 eventos no citómetro de fluxo (FACSCalibur). Os resultados foram analisados no programa CellQuestPRO.

3.7.2. Estudo da apoptose/necrose

Apoptose, ou morte programada das células, é um processo fisiológico normal de eliminação de células indesejadas. Um dos eventos de apoptose inclui a translocação da fosfatidilserina (PS) da parte interior da membrana plasmática para a sua superfície, ficando exposta ao ambiente extracelular, e precede o evento de perda da integridade da membrana ^{lii}.

A anexina-V é uma proteína de ligação fosfolipídica dependente de Ca^{2+} , com elevada afinidade para a PS. Quando ligada a um fluoróforo, no caso fluoresceína (FITC), pode ser excitada a 488 nm emitindo fluorescência vermelha com determinada intensidade ^{liii}.

A coloração com anexina-V é tipicamente utilizada em conjunto com o corante iodeto de propídio (IP), que possui afinidade para ácidos nucleicos, de forma a identificar células apoptóticas e necróticas. As células viáveis com membranas intactas excluem o IP, enquanto que as membranas de células mortas e danificadas são permeáveis ao IP. Assim, células viáveis não são marcadas pelas anexina-V e IP, células em necrose apenas se ligam ao IP, células em apoptose precoce ligam apenas à anexina-V e células em apoptose tardia ou já mortas ligam-se a ambos os marcadores ^{xlvii, xlii}.

Os promastigotas em fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram incubados na presença do composto mais ativo à concentração CI_{50} , em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) suplementado com 10% SBF inativado, a 26°C, durante 24 horas. Os controlos do veículo de dissolução realizaram-se sob as mesmas condições, sem composto e na presença de DMSO em concentrações iguais às presentes nos ensaios com os compostos. A miltefosina (40 μ M) foi usada como controlo positivo.

Após o tempo de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação e incubadas com 5 μ L de anexina-V/FITC e 5 μ L de IP (AnnexinV-FITC Apoptosis detection Kit, Immunostep) por 15 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Posteriormente foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação e foi efetuada a análise por citometria de fluxo (FacsCalibur). Os resultados foram analisados no programa CellQuest PRO.

3.7.3. Estudo da integridade da membrana celular

Os promastigotas em fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram incubados na presença do composto mais ativo à concentração CI_{50} , em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) suplementado com 10% SBF inativado, a 26°C, durante 24 horas. Após este tratamento, os parasitas são lavados e ressuspensos em PBS. De seguida marcaram-se os parasitas com o sonda PI (0,2 μ M) e incubou-se durante 5 minutos.

Os controlos do veículo de dissolução realizaram-se sob as mesmas condições, sem composto e na presença de DMSO em concentrações iguais às presentes nos ensaios com os compostos. A miltefosina (40 μ M) foi usada como controlo positivo.

Por último procedeu-se à análise de 10000 eventos no citómetro de fluxo (FacsCalibur). Os resultados foram analisados no programa ModFit LT V 2.0.

3.7.4. Estudo do volume celular

Os promastigotas em fase logarítmica (4×10^6 células/mL) foram incubados na presença do composto mais ativo à concentração CI_{50} , em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) suplementado com 10% SBF inativado, a 26°C, durante 24 horas.

Após o tratamento das promastigotas com o composto triterpenóide mais ativo, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS. Os controlos do veículo de dissolução realizaram-se sob as mesmas condições, sem composto e na presença de DMSO em concentrações iguais às presentes nos ensaios com os compostos. A miltefosina (40 μ M) foi usada como controlo positivo.

Por último procedeu-se à análise de 10000 eventos no citómetro de fluxo (FacsCalibur). Os resultados foram analisados no programa CellQuest PRO.

3.8. Análise estatística

Todas as experiências foram efetuadas em triplicado e ensaios controlo foram realizados em todos os ensaios, sob as respetivas condições, na ausência do composto e presença do veículo de dissolução (DMSO).

A média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes foram determinados e a análise estatística foi efetuada por testes de student t e ANOVA com Dunnet's post-test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Capítulo IV

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. Atividade anti-*Leishmania* dos derivados triterpenóides do ácido ursólico em promastigotas

A susceptibilidade dos promastigotas de *L. infantum* aos dezanove derivados do ácido ursólico (AU) foi avaliada por estudos de viabilidade celular recorrendo ao teste de MTT. Os parasitas foram incubados na presença dos diferentes compostos em concentrações crescentes, entre 10 e 200 μM , durante 24 horas. Após incubação, adicionou-se o MTT e duas horas depois a absorvância foi lida a 530 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis relativamente ao controlo.

Dos dezanove derivados do ácido ursólico estudados, apenas sete induziram redução da viabilidade celular dos promastigotas.

Os compostos 15, 18, 29, 30, 45, 48 e 196, apresentam atividade anti-*Leishmania* verificando-se que a susceptibilidade dos promastigotas está diretamente relacionada com a concentração utilizada do composto (Fig. 14).

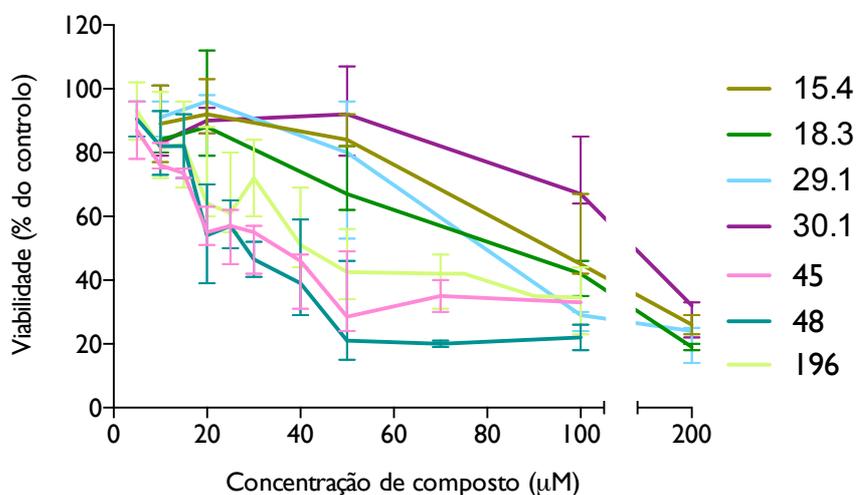


Figura 14: Efeito dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular dos promastigotas de *Leishmania infantum*. As culturas de parasitas em fase logarítmica de crescimento (2×10^6 células/mL) foram incubadas durante 24 horas na presença de concentrações crescentes dos derivados do AU. Os valores médios e erros padrão foram calculados a partir de três ensaios independentes, excepto para os compostos 45, 48 e 196 para os quais se realizaram 6 ensaios.

O estudo comparativo da susceptibilidade de *Leishmania* aos derivados do ácido ursólico foi realizado através da análise dos valores de concentração inibitória a 50% (CI_{50}), valores estes

que representam a concentração que inibe em 50% a viabilidade dos promastigotas *L. infantum*. Os valores de CI_{50} foram determinados para todos os derivados, a partir das curvas dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 6 (Tabela I).

De todos os derivados do ácido ursólico, os compostos 45, 48 e 196 demonstraram ter atividade leishmanicida promissora com IC_{50} inferior a 50 μM .

Os compostos 15, 18 e 29 apresentaram valores de CI_{50} entre 80 e 137 μM , apresentando menor atividade em *L. infantum*.

Para os compostos 30, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 e 65 a concentração máxima testada não inibiu a viabilidade a 50% e por isso o valor de CI_{50} foi apresentado como $>200 \mu M$ (Tabela I).

Tabela I: Concentração inibitória a 50% (CI_{50}) dos derivados do ácido ursólico na viabilidade celular dos promastigotas de *Leishmania infantum*.

Derivados do ácido ursólico	$CI_{50} \mu M$ (IC)*	R ²
15	107.7 (90.31 a 128.5)	0.8207
18	80.74 (66.99 a 97.31)	0.8703
29	137.1 (114.2 a 164.7)	0.8736
30	>200	-
45	29.68 (26.40 a 33.36)	-
48	28.24 (24.62 a 32.38)	0.8490
52	>200	0.8414
53	>200	-
54	>200	-
55	>200	-
56	>200	-
57	>200	-
58	>200	-
59	>200	-
60	>200	-
61	>200	-
62	>200	-
65	>200	-
196	46.77 (39.80 a 54.96)	0.7743

*IC, intervalo de confiança de 95%

Avaliando-se individualmente os derivados do AU, pode-se observar diferenças na susceptibilidade dos promastigotas de *L. infantum*, indicando que a atividade leishmanicida dos compostos está condicionada pela estrutura química dos compostos.

4.2. Citotoxicidade em células de mamífero

Os valores de concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) foram determinados para os compostos 48 e 196, recorrendo ao teste de MTT. As concentrações utilizadas foram de 5 a 50 μM e a incubação decorreu a 36°C durante 24 horas. A absorvância foi lida a 530 nm e os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis relativamente ao controlo (Fig. 15).

Os valores de concentração citotóxica para 50% dos macrófagos foram calculados a partir das curvas dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 6.

Os compostos 48 e 196 induziram perda de viabilidade em células de macrófagos RAW 264.7 (Tabela 2).

De forma a determinar a especificidade das moléculas, calcularam-se os índices de seletividade (IS), através da razão entre a CC_{50} dos macrófagos e a CI_{50} dos promastigotas (Tabela 2).

Ainda que os índices de seletividade não sejam muito promissores, o derivado 48 foi aquele que apresentou maior seletividade para os promastitas *Leishmania*.

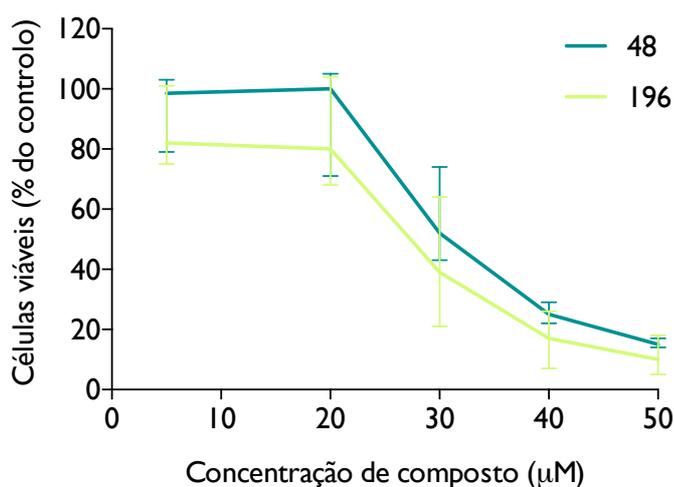


Figura 15: Efeitos citotóxicos dos derivados do ácido ursólico em macrófagos (células RAW 264.7). As culturas de macrófagos em monocamada confluyente foram incubadas durante 24 horas na presença de concentrações crescentes dos derivados 48 e 196 do ácido ursólico. Os valores médios e erros padrão foram calculados a partir de três experiências independentes.

Tabela 2: Concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) dos derivados do ácido ursólico em macrófagos (células RAW 264.7).

Derivados do ácido ursólico	CC50 μ M (IC)*	R ²	IS
48	32.08 (27.66 - 37.22)	0.8193	1.13
196	27.94 (25.59 - 30.50)	0.8612	0.60

*IC, intervalo de confiança a 95%

4.3. Atividade anti-*Leishmania* dos derivados triterpenóide do ácido ursólico em amastigotas intracelulares

O efeito do composto 48 na interação parasita-hospedeiro foi avaliada recorrendo a macrófagos peritoneais isolados de murganhos BALB/c infetados com *L. infantum*.

Após a infeção *in vitro* dos macrófagos peritoneais com *L. infantum*, procedeu-se ao tratamento com o derivado do ácido ursólico 48 durante 24 horas.

Após coloração de Giemsa e montagem das lamelas determinou-se o número total de macrófagos intactos e destes quais estavam infetados, bem como o número de amastigotas presentes em cada macrófago infetado por observação ao microscópio óptico com a objetiva 100x.

Na figura 16 estão representados macrófagos peritoneais infetados e não infectados, respeitantes ao controlo (A e B) e aos tratados (C a H) em diferentes concentrações.

A integridade dos macrófagos foi afetada nas concentrações elevadas do composto 48 quando comparadas às células controlo (Fig. 16 A, C, E e G).

O número de macrófagos infetados por amastigotas diminuiu com o aumento da concentração do composto 48 bem como o número de amastigotas por macrófagos (Fig. 16 B, D, F e H).

A determinação da CI₅₀ em amastigotas intracelulares foi realizada a partir dos valores de percentagem dos índice de sobrevivência (Fig. 17).

O valor de concentração inibitória a 50% do derivado 48 em amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi de $12,69 \pm 0,44 \mu$ M. Uma vez que o valor da CI₅₀ na forma promastigota determinado foi $28,24 \mu$ M, conclui-se que a susceptibilidade nos amastigotas é cerca de 2.2 vezes superior.

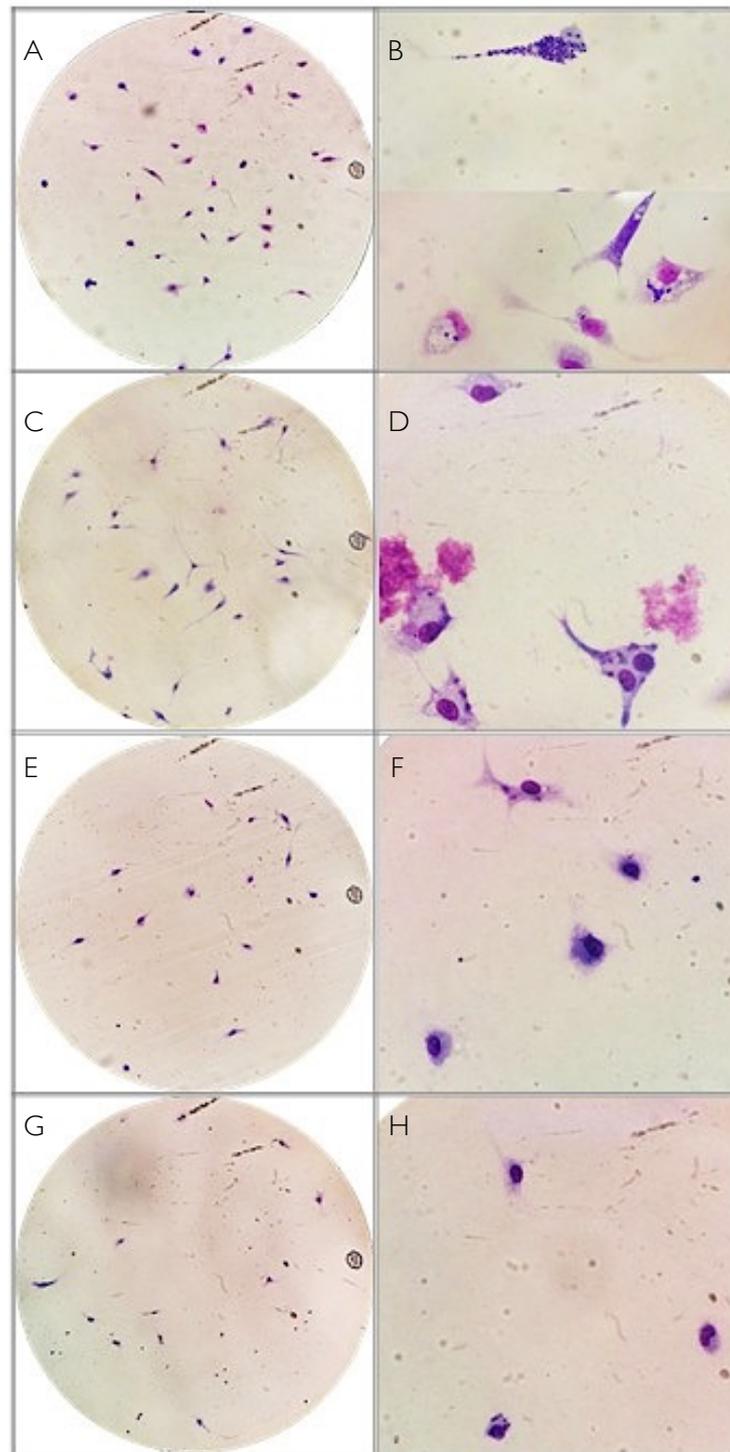


Figura 16: Imagens obtidas por microscopia óptica dos macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por amastigotas de *Leishmania infantum* após incubação durante 24 horas a 26°. Células controle incubadas na ausência de tratamento: ampliação 40x (A) e ampliação 100x (B). Células expostas ao derivado do ácido ursólico 48: na concentração 10 μM com ampliação 40x (C) e 100x (D); na concentração 15 μM com ampliação 40x (E) e 100x (F); na concentração 20 μM com ampliação 40x (G) e 100x (H).

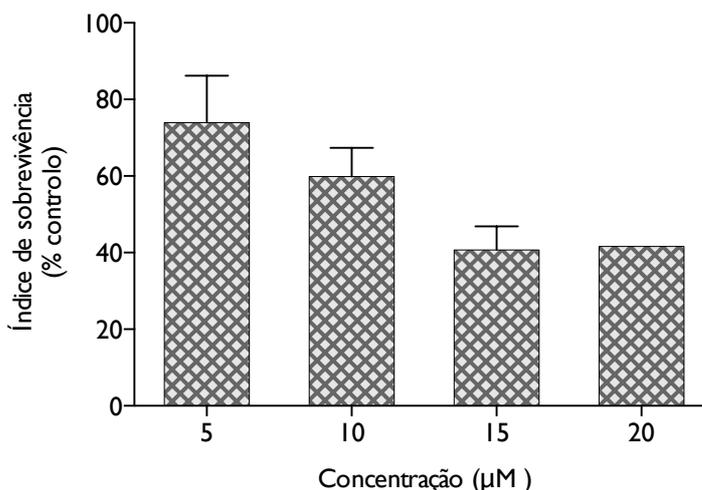


Figura 17: Efeito do composto 48 na viabilidade dos amastigotas intracelulares *Leishmania infantum*. Macrófagos peritoneais infectados por amastigotas foram incubadas durante 24 horas na presença de concentrações crescentes do derivado 48 do ácido ursólico.

A citotoxicidade do composto 48 para os macrófagos RAW 264.7 e a susceptibilidade para os protozoários na forma amastigota foi também comparada. O índice de seletividade foi calculado segundo a razão entre a CC_{50} em macrófagos e a CI_{50} em amastigotas intracelulares. O IS obtido foi 2.53. Este índice de seletividade é duas vezes superior ao obtido em promastigotas, ou seja, para a forma amastigota intracelular o derivado 48 é mais seletivo do que para a forma promastigota.

4.4. Efeitos no volume e integridade da membrana celular de promastigotas de *Leishmania infantum*

O volume dos parasitas de *Leishmania infantum* foi analisado em citometria de fluxo após a incubação com o composto 48 na CI_{50} e $2x CI_{50}$, durante 24 horas a $26^{\circ} C$.

Observou-se diminuição do volume dos parasitas tratados quando comparado com o controle (Fig. 18 A).

Contudo, através da análise estatística de variância (two-way ANOVA) não foi observada uma variação significativa da diminuição do volume dos parasitas quando tratados na CI_{50} .

Nos parasitas tratados com o dobro da concentração inibitória a 50% o resultado foi estatisticamente significativo ($*p < 0,05$) (Fig. 18 B), ou seja, o composto 48 induziu diminuição no volume dos promastigotas, dependente da dose.

Nos promastigotas tratadas com miltefosina, o volume médio das células é significativamente ($p < 0,001$) menor em relação ao controlo negativo (Fig. 18 B)

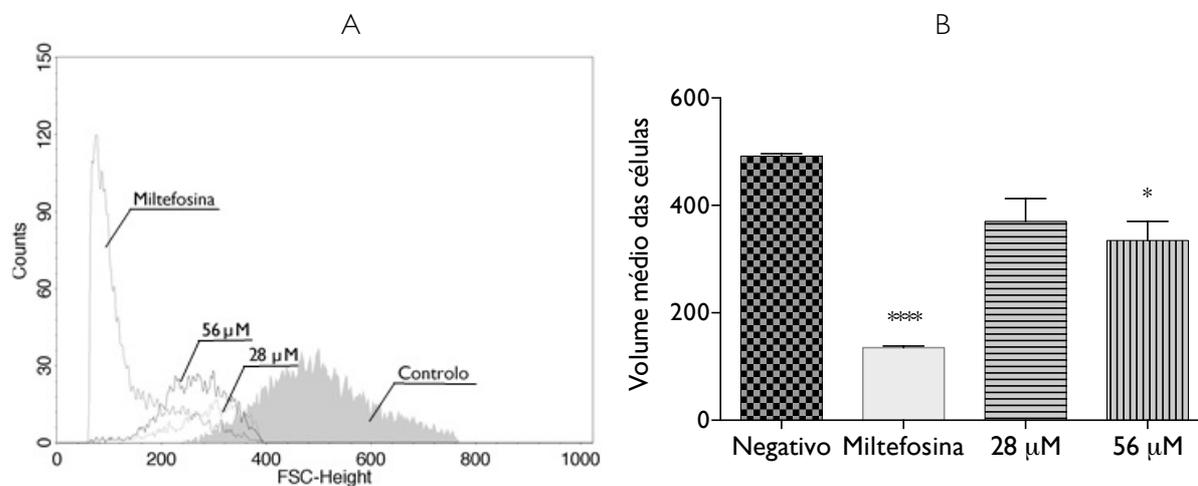


Figura 18: Análise do volume celular por citometria de fluxo de promastigotas *Leishmania infantum* não tratados e tratados com o composto 48 e miltefosina. Os promastigotas, em fase logarítmica de crescimento 4×10^6 células/mL, foram incubados durante 24 horas na ausência e presença do derivado 48 do ácido ursólico na Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$ e de miltefosina. As células foram analisadas por citometria de fluxo. A- Histograma representativo do volume dos promastigotas na ausência e na presença do composto 48 (28 e 56 μ M) e miltefosina. B- Representação gráfica dos valores médios de volume celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

De forma a estudar o efeito do composto 48 na integridade da membrana celular dos parasitas de *L. infantum*, os promastigotas foram marcados com a sonda iodeto de propídio (IP) e analisados no citómetro de fluxo (Fig. 19). Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas a IP.

Os parasitas tratados com o composto 48 (Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$) apresentam uma baixa população marcada pela sonda IP (quadrante esquerdo superior), indicando que o composto não induz ruptura da membrana (Fig. 19 C e D). Como esperado, com a digitonina, a percentagem de células marcadas por IP é maior (Fig. 19 B).

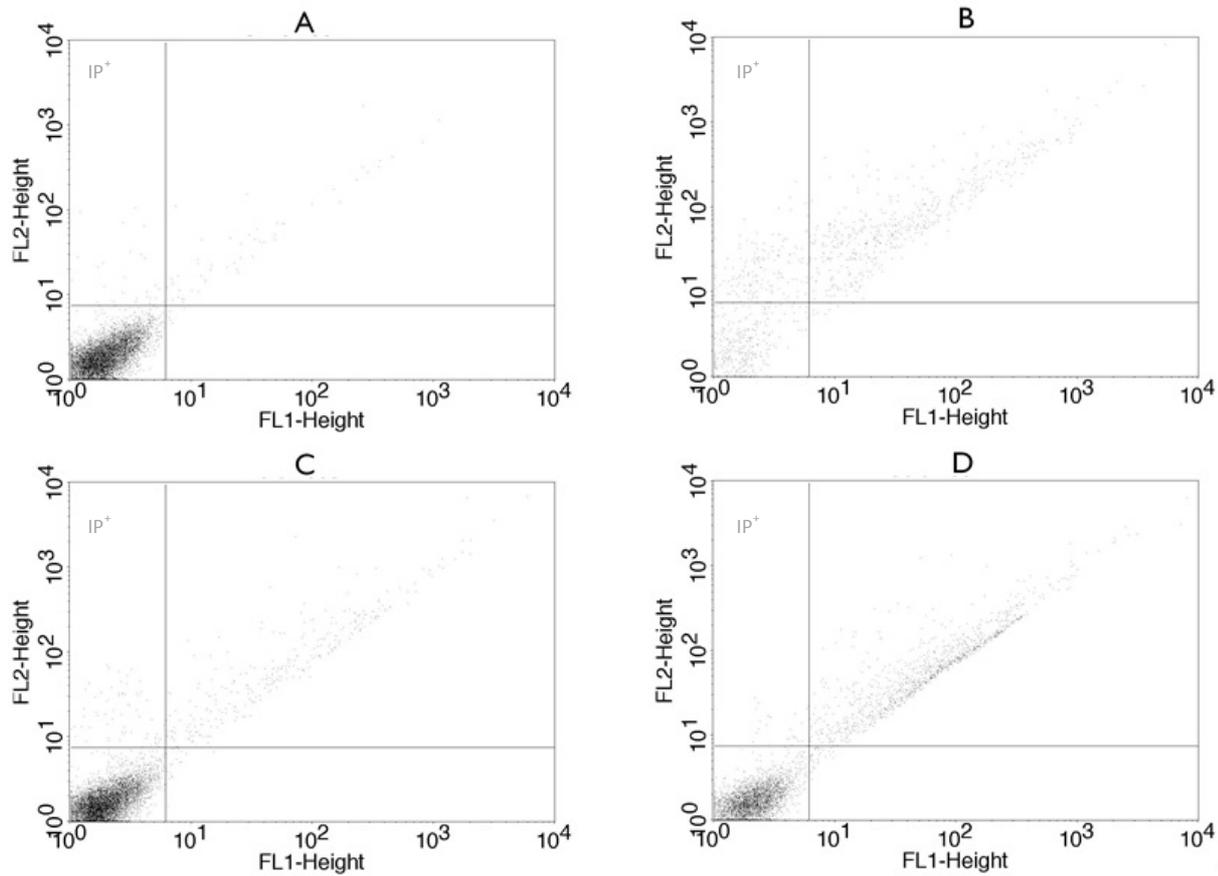


Figura 19: Histogramas representativos de promastigotas de *Leishmania infantum* tratados com o composto 48 e marcados por IP. Os promastigotas foram incubados durante 24 horas na ausência e presença do derivado 48 do ácido ursólico na Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$. As células foram marcadas com IP e analisadas por citometria. A digitonina a 40 μM foi usada como controlo positivo. (A) Controlo na ausência de tratado; (B) Digitonina 40 μM ; (C) Composto 48 à Cl_{50} ; (D) Composto 48 a $2 \times Cl_{50}$.

A análise estatística mostra que a integridade da membrana dos promastigotas não foi significativamente afetada pelo tratamento com o composto 48 quando usado na Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$ (Fig. 20). Em relação ao controlo positivo de necrose, a digitonina, observa-se a ruptura da membrana de forma significativa ($p < 0,001$) (Fig. 20).

Assim, a morte celular por necrose não parece ser um dos mecanismos de ação principal do composto 48.

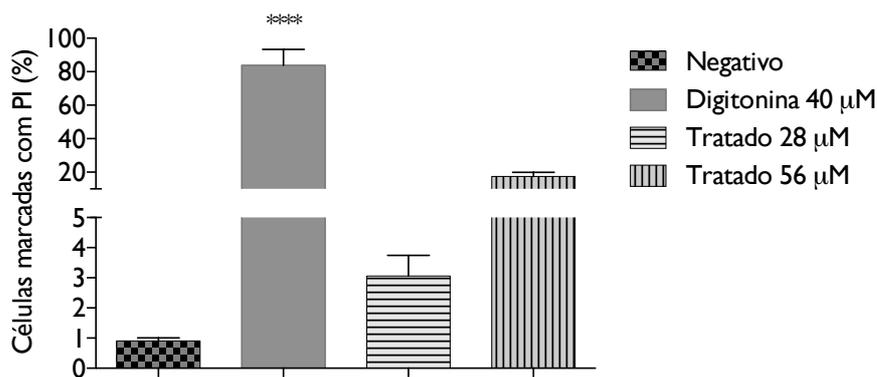


Figura 20: Promastigotas de *Leishmania infantum* marcados com IP após 24 horas de incubação na ausência e presença do derivado 48, na CI_{50} , $2 \times CI_{50}$ e digitonina. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6 (two-way ANOVA). Nível de significância * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A ocorrência de apoptose e/ou necrose em promastigotas de *L. infantum* quando expostos ao composto 48 foi avaliada através da marcação dos parasitas com a anexina-V e iodeto de propídio e posterior quantificação das células marcadas por citometria de fluxo.

Os promastigotas foram incubados por 24 horas a $26^{\circ} C$ na ausência e presença do composto 48 na CI_{50} , dobro da CI_{50} . Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas para anexina-V/FITC e IP, relativamente ao número de células totais analisadas.

Observou-se uma diminuição na percentagem de promastigotas viáveis quando expostos ao composto 48 e aumento da percentagem de células marcadas com a anexina-V e IP, dependendo da concentração a que as células foram expostas (Fig. 21 B, C).

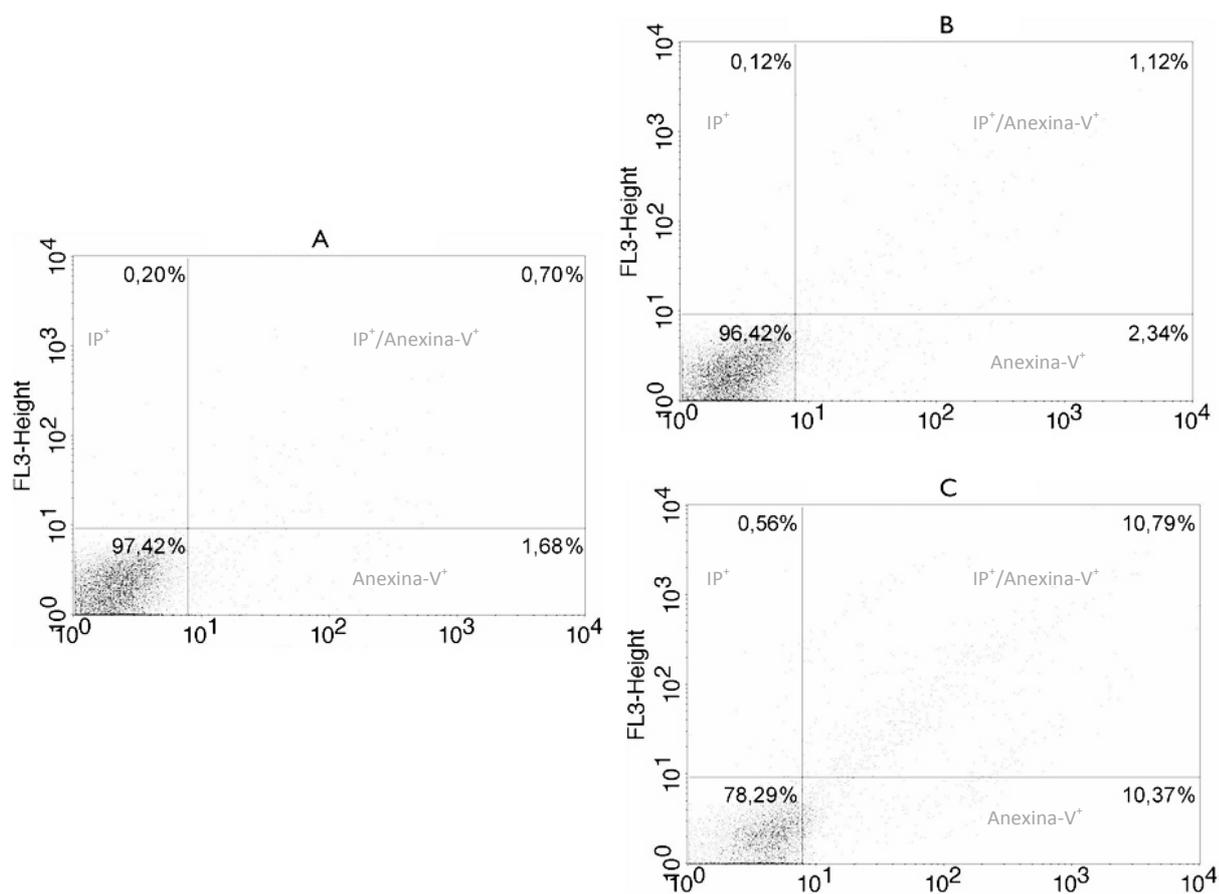


Figura 21: Histogramas representativos da percentagem de promastigotas de *Leishmania infantum* marcados por IP e anexina-V após exposição ao composto 48. Os promastigotas foram incubados durante 24 horas na ausência e presença do derivado 48 do ácido ursólico na Cl₅₀ e 2xCl₅₀. As células foram marcadas com anexina-V e IP e analisadas por citometria. (A) Controlo (ausência de tratamento); (B) Composto 48 à Cl₅₀; (C) Composto 48 a 2xCl₅₀.

Em promastigotas de *L. infantum* não tratados, a percentagem de células ligadas à anexina-V foi 1,72% (Tabela 3). Após o tratamento com o derivado 48, a percentagem de células marcadas pela anexina-V aumentou para 2,08% (Tabela 3) e quando expostas ao dobro da Cl₅₀ a percentagem aumenta para quase 7,20% (Tabela 3). Ou seja, a percentagem de células marcadas pela anexina-V, indicador da apoptose, foi quatro vezes superior, nas células tratadas em comparação à percentagem de células controlo.

Apesar de não se verificar um grande aumento na percentagem de células ligadas ao marcador anexina-V à Cl₅₀, o resultado com 2xCl₅₀ demonstra que a morte celular dos promastigotas via apoptose é possível.

Os resultados mostram, também, que o composto 48 induziu um aumento, dependente da dose, das células marcadas por anexina-V e IP. Nas células sujeitas a 2xCl₅₀, a percentagem de

células positivas à anexina-V e IP é sete vezes superior quando comparado com o controlo. Este resultado sugere que o composto 48 induz apoptose tardia dos parasitas *L. infantum*.

Tabela 3: Promastigotas de *Leishmania infantum* marcados com anexina-V e IP após exposição ao composto 48.

	Entidades intracelulares da Leishmania (% de células)	
	Anexina-V e IP	Anexina-V
Controlo	2,52 ± 0,24	1,72 ± 0,16
28µM	3,57 ± 0,32	2,08 ± 0,30
56µM	17,40 ± 3,39	7,20 ± 2,68

4.5. Paragem do ciclo celular em promastigotas de *Leishmania infantum*

Os promastigotas de *L. infantum* foram tratados com o composto 48 (Cl_{50} e dobro da Cl_{50}) durante 24 horas, juntamente com os controlos (sem tratamento e com miltefosina), e depois foram marcados com IP. A distribuição dos parasitas pelas diferentes fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo e os resultados foram expressos em percentagem de células positivas em cada fase do ciclo celular (Fig. 22).

Observa-se um aumento de células na fase G_0/G_1 do ciclo celular, para os promastigotas tratados com a Cl_{50} , quando comparado ao controlo. Quando se analisa o histograma referente às células tratadas com o dobro da Cl_{50} , mais acentuado é esse aumento (Tabela 4).

Em relação às fases S e G₂/M observa-se uma diminuição do número de células nas amostras tratadas com o composto 48 (Fig. 22 e Tabela 4).

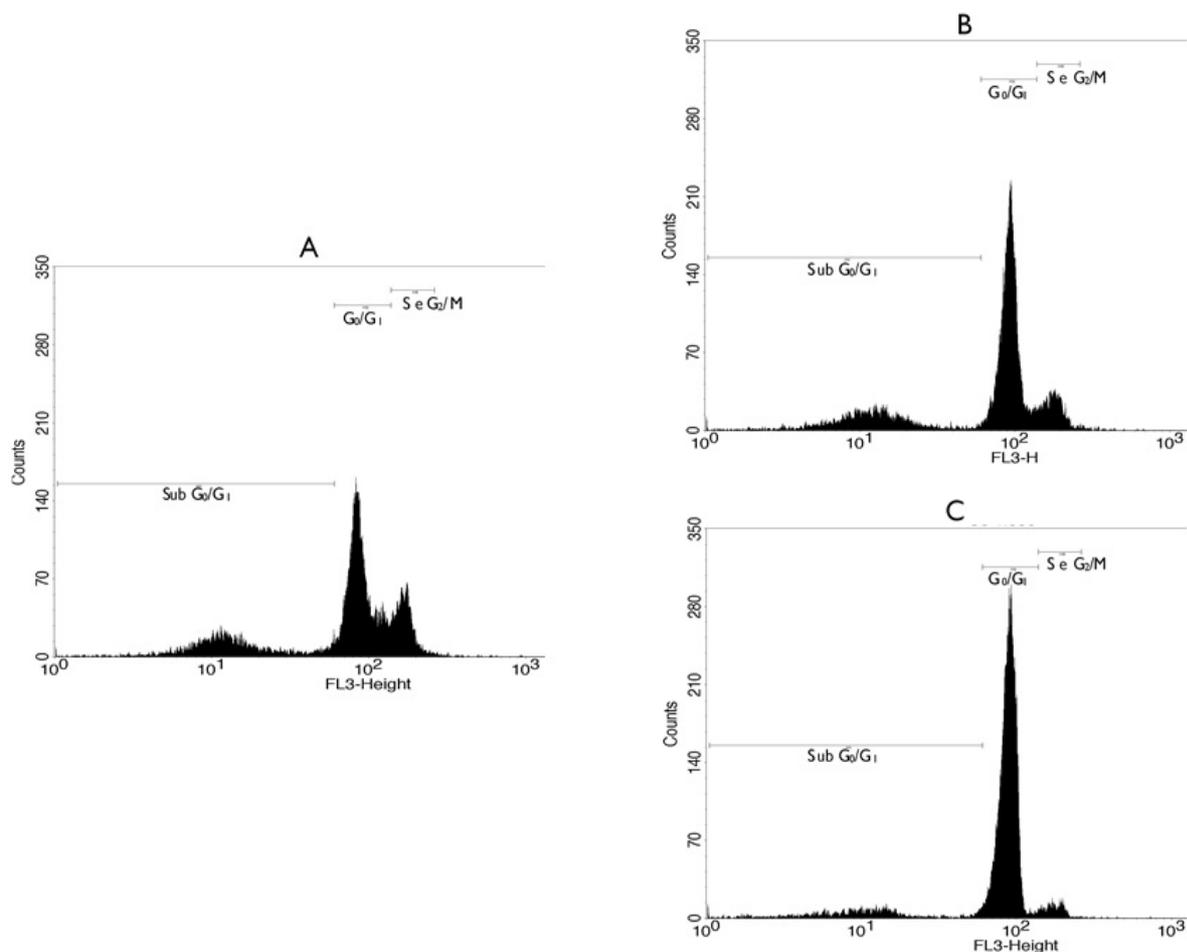


Figura 22: Histogramas representativos do conteúdo de DNA de promastigotas de *Leishmania infantum* expostos ao composto 48. Os promastigotas, em fase logarítmica de crescimento (4×10^6 células/mL), foram incubados durante 24 horas na ausência e presença do derivado 48 do ácido ursólico na Cl_{50} e $2 \times Cl_{50}$. As células foram marcadas com IP e analisadas por citometria de fluxo. (A) Células controlo (ausência de tratamento); (B) Células exposta ao composto 48 à Cl_{50} ; (C) Células expostas ao composto 48 a $2 \times Cl_{50}$.

Embora ocorra uma paragem no ciclo celular na fase G₀/G₁ (Tabela 4) após 24h de incubação com o composto 48 na concentração IC_{50} , o resultado não é estatisticamente significativo. Contudo, quando as células são sujeitas ao tratamento com $2 \times IC_{50}$ há um significativo aumento de parasitas (81%) na fase G₀/G₁ do ciclo celular, dependente da concentração ($p < 0,001$). O derivado 48 afeta a proliferação dos promastigotas ao aumentar as células na fase G₀/G₁ e diminuir na S e G₂/M.

Tabela 4: Efeitos do composto 48 no ciclo celular de *Leishmania infantum*.

	% de células presentes nos diferentes estágios do ciclo celular		
	Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S e G ₂ /M
Controlo	27,73 ± 1,94	54,12 ± 1,12	17,29 ± 1,55
28 µM	28,05 ± 3,06	59,22 ± 2,51	11,85 ± 1,12
56 µM	14,61 ± 2,32	81,24 ± 1,69	3,99 ± 0,59
Miltefosina 30 µM	94,12 ± 0,46	3,82 ± 0,65	0,93 ± 0,29

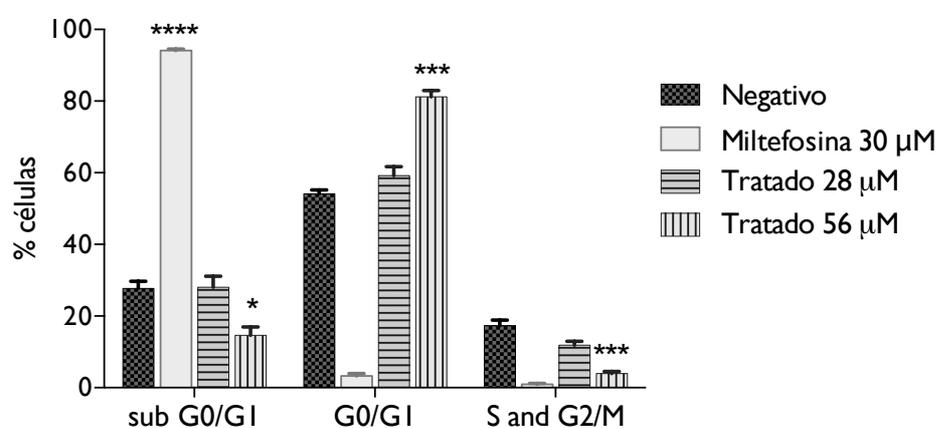


Fig. 23: Distribuição de promastigotas de *Leishmania infantum* pelas diferentes fases do ciclo celular, após exposição ao derivado 48 na CI₅₀. Os resultados foram calculados a partir de três ensaios independentes por análise estatística no programa GraphPad Prism 6. Nível de significância *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

4.6. Alterações dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e das espécies reativas de oxigénio

Os promastigotas foram inicialmente marcados com a sonda Fluo-4/AM e posteriormente foram incubados durante 24 horas na presença do composto 48 na concentração IC₅₀ e do peróxido de hidrogénio (controlo positivo). A concentração de Ca²⁺ livre foi calculada com base em leituras de fluorescência em intervalos de tempo estabelecidos previamente.

O composto 48 induziu um aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelulares (Fig 24).

Para todos os tempos de medição, a concentração de cálcio intracelular livre nos promastigotas expostos ao derivado 48 aumentou significativamente ($p < 0,001$) em relação aos promastigotas sem tratamento.

As leituras a partir dos 20 minutos demonstraram uma diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico para quase metade, quando comparada com a primeira leitura aos 10 minutos. Nas leituras seguintes as concentrações mantêm-se relativamente estáveis para os tempos de medição.

Os resultados sugerem que o composto 48 induz o desequilíbrio homeostático dos níveis de cálcio citosólico nos parasitas de *L. infantum*.

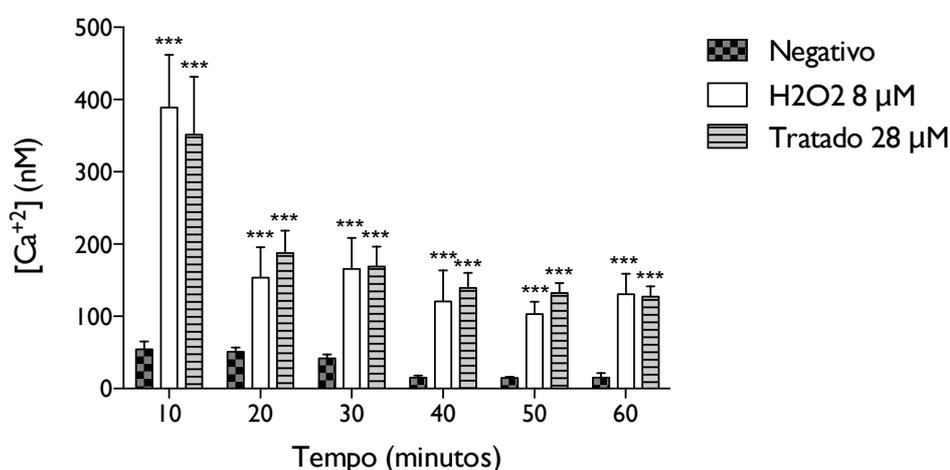


Figura 24: Níveis de cálcio citosólico em promastigotas *Leishmania infantum* expostos ao composto 48. As alterações do cálcio intracelular foram medidas pela marcação de promastigotas de *L. infantum* (10^7 células/mL) com Fluo 4 AM após 24 horas de tratamento com o composto 48 na Cl_{50} ou com H_2O_2 (controlo positivo). Os resultados foram calculados a partir de três ensaios independentes por análise estatística no programa GraphPad Prism 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A produção endógena de espécies reativas de oxigénio (ROS) em promastigotas de *L. infantum* tratados durante 24 horas com o derivado 48, foi estudada por fluorescência com o marcador H_2DCFDA .

Através do tratamento estatístico dos valores de absorvância, verifica-se que não há alteração na geração de ROS intracelulares quando é administrado o derivado 48 na concentração inibitória a 50%. No entanto, há aumento da fluorescência quando os parasitas são expostos ao mesmo composto no dobro da Cl_{50} , quando comparado com o controlo (Fig. 25).

O composto 48 induz alteração da produção endógena de espécies reativas de oxigénio pelos promastigotas de *L. infantum*, dependente da dose.

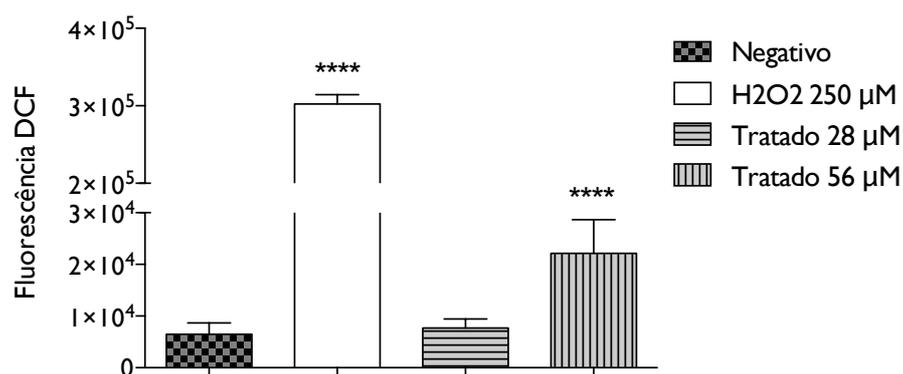


Figura 25: Geração de espécies reativas de oxigênio na presença do composto 48 à Cl_{50} e $2xCl_{50}$. A indução de espécies reativas de oxigênio foi medida pela marcação de promastigotas de *Leishmania infantum* (4×10^6 células/mL) com H_2DCFDA e tratamento com o composto 48 (Cl_{50} ; $2xCl_{50}$) ou H_2O_2 durante 24 horas. Os resultados foram calculados a partir de três ensaios independentes por análise estatística no programa GraphPad Prism 6. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$.

4.7. Alterações morfológicas observadas em microscopia óptica

Com base no estudo em microscopia óptica de contraste de fases e microscopia óptica após coloração e Giemsa, foi possível observar as alterações morfológicas induzidas pelo composto 48 atendendo à forma, tamanho, refringência e mobilidade dos promastigotas de *Leishmania infantum*.

No estudo em contraste de fases, as células controlo apresentaram-se móveis, com forma fusiforme característica e com o flagelo a emergir da região anterior do parasita (Fig. 26 A). O derivado 48 induziu alterações morfológicas após 24 horas de incubação. Os parasitas ficaram mais arredondados. A mobilidade também diminuiu, bem como o número de células (Fig. 26 B).

Em microscopia óptica após coloração de Giemsa os promastigotas apresentam forma característica, flagelo comprido a emergir da região anterior do parasita, núcleo central e cinetoplasto posterior ao núcleo (Fig. 27 A). Os promastigotas de *Leishmania* expostos ao composto 48 apresentavam-se menos fusiformes (Fig. 27 B).

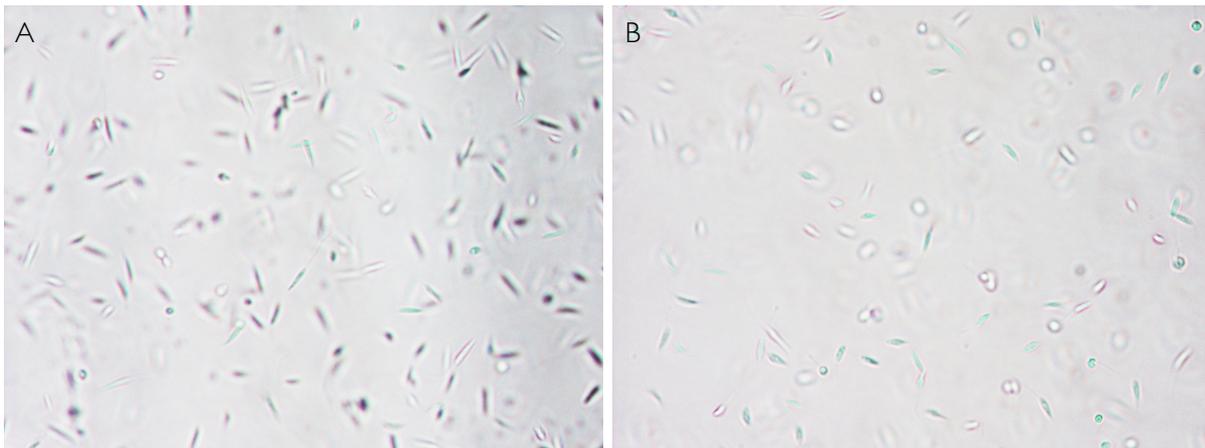


Figura 26: Observação por microscopia de contraste de fases dos promastigotas de *Leishmania infantum*. A, células não tratadas (controlo) incubadas com DMSO (veículo), forma alongada típica e elevada mobilidade; B, Células incubadas com o composto 48 na Cl_{50} , promastigotas mais pequenos, com forma arredonda e pouca mobilidade. Ampliação 200x.

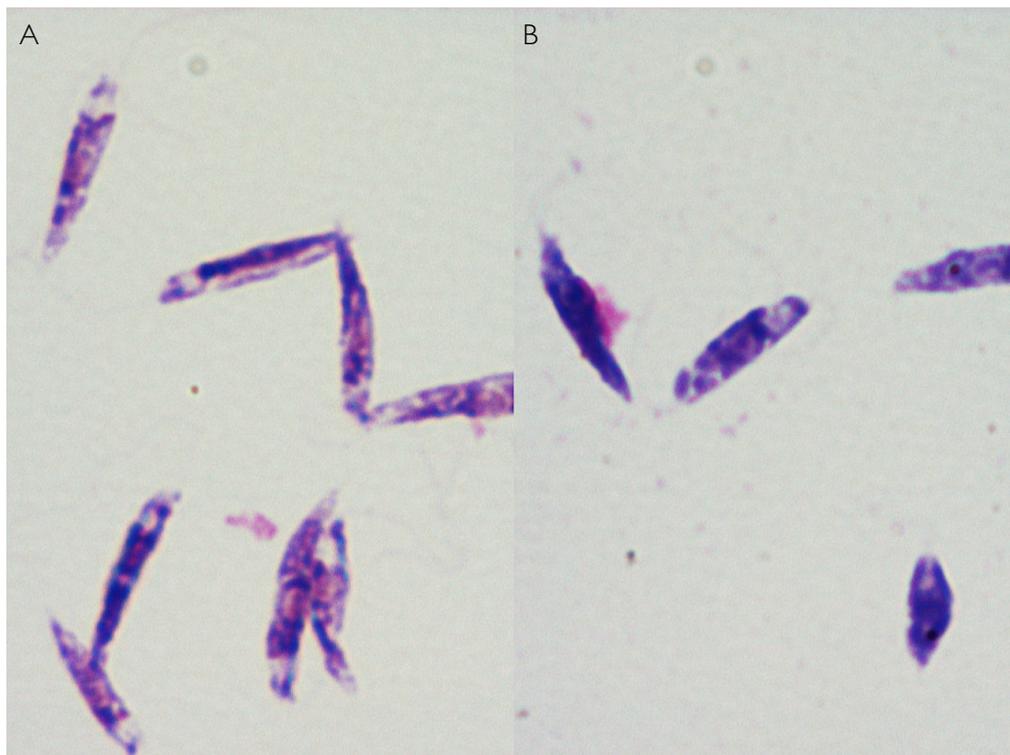


Figura 27: Oservação por microscopia óptica dos promastigotas de *Leishmania infantum* após coloração de Giemsa. A, células não tratadas (controlo) incubadas com DMSO (veículo), forma fusiforme típica, núcleo, cinetoplasto e um flagelo anterior comprido; B, Células incubadas com o composto 48 na Cl_{50} , promastigotas mais pequenos e mais arredondados. Ampliação 1000x.

Capítulo V

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar dos recentes desenvolvimentos, o tratamento da leishmaniose continua insatisfatório. Antimoniais pentavalentes, miltefosina e glucantime continuam a ser o tratamento de primeira linha para este tipo de infecção nas áreas mais endêmicas, apesar das suas limitações, como a elevada toxicidade e aumento da resistência aos fármacos^{liv, lv}.

Desta forma, é urgente a descoberta de novos fármacos, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

De acordo com diversos autores, compostos derivados de produtos naturais, incluindo alcaloides, chalconas, triterpenóide^{lvi, lvii, lviii, lix, lx}, entre outros, representam novos fármacos, bem como compostos de partida para modificações químicas que podem dar origem a derivados com melhor atividade, propriedades farmacocinéticas melhoradas, com novos mecanismos de ação e menos efeitos adversos.

Neste trabalho foi avaliada a atividade leishmanicida de 19 derivados do ácido ursólico, nas formas promastigota e amastigota de *Leishmania infantum* através de estudos de viabilidade celular.

Os ensaios de susceptibilidade são desenvolvidos com o objetivo de encontrar o maior número de estruturas moleculares com atividade antimicrobiana, ou de entre elas, um composto *lead* otimizado, no menor período de tempo e custo possível^{lxi}.

De entre os 19 compostos sujeitos a *screening*, três mostraram ter atividade relevante anti-*Leishmania infantum* em promastigotas. Os compostos **45**, **48** e **196** apresentam atividade em concentrações inferiores a 100 μM e o composto mais ativo, com a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) mais baixo, foi o derivado **48** ($\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{M}$).

O *screening* de susceptibilidade em *Leishmania* é normalmente desenvolvido em culturas de promastigotas, uma vez que são fáceis de crescimento e manutenção, são formas extracelulares e móveis. No entanto, o metabolismo destas formas não é totalmente igual ao metabolismo da forma amastigota intracelular, sendo este o alvo a atingir no hospedeiro vertebrado. Uma vez que existem algumas limitações quando se pretende avaliar a susceptibilidade da forma amastigota, como a obtenção de macrófagos susceptíveis, número suficiente de amastigotas intracelulares ou mesmo cultivar em laboratório parasitas representativos na forma intracelular, só as moléculas promissoras no *screening* inicial de promastigotas é que avançam para a forma amastigota..

Neste trabalho, a susceptibilidade dos amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* foi realizada em macrófagos intraperitoneais isolados de murganhos BALB/c, sacrificados por

deslocamento cervical, e infetados por promastigotas de *Leishmania infantum*. O derivado **48** apresentou atividade anti-*Leishmania* com IC₅₀ de 12,69 µM. Se compararmos este IC₅₀ com o obtido para os parasitas na forma promastigota, podemos concluir que os amastigotas foram duas vezes mais susceptíveis ao composto **48** do que a forma flagelada. Estes resultados são idênticos à maioria dos estudos publicados para compostos sintéticos e extratos naturais. De fato infecção de macrófagos por promastigotas infetivos e posterior tratamento tem vindo a demonstrar, que a forma amastigota é mais susceptível que a forma promastigota^{lxii, lxiii, lxiv, lxv, lxvi, lxvii}, ainda que em alguns a atividade tenha sido semelhante ou inferior^{lxviii, lxix, lxx, lxxi}. Também já foi demonstrado que a atividade de fármacos anti-*Leishmania* em amastigotas intracelulares depende das células hospedeiras^{lxxii, lxxiii}.

No desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento da leishmaniose é importante estudar a citotoxicidade das moléculas promissoras em células do hospedeiro de forma a avaliar a seletividade dos compostos para os parasitas. Deste modo, avaliou-se o efeito citotóxico dos compostos **48** e **196** em linhas celulares de macrófagos (RAW 264.7). Os compostos apresentaram citotoxicidade nos macrófagos, contudo, o índice de seletividade foi para o composto **48** superior a dois, ou seja, o composto é duas vezes mais seletivo para os amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*.

No presente trabalho foram também estudados possíveis mecanismos de acção responsáveis pela atividade biológica do derivado **48**. A avaliação de alterações morfológicas, morte celular por apoptose e/ou necrose, ciclo celular e alterações dos níveis de cálcio e espécies reativas de oxigénio intracelulares, foi realizada na presença do derivado **48** em concentração Cl₅₀ e 2xCl₅₀.

Os resultados demonstraram que o composto **48** não alterou de forma significativa a integridade da membrana plasmática e induziu a exposição da fosfatidilserina, sendo que a exteriorização desta é considerada um marcador de apoptose^{lxxiv}. Os resultados obtidos em citometria de fluxo com a anexina-V e IP indicam que o composto **48** induz apoptose e apoptose tardia. Estudos realizados com triterpenóides, o ácido ursólico^{lxxv} e o ácido 2, 3-dihidrobetulínico (ADHB), demonstraram a indução da morte programada em *Leishmania*^{lxxvi}. O ácido ursólico e alguns dos seus derivados inibem a proliferação de células tumorais e induzem a apoptose por vias intrínsecas e extrínsecas^{lxxvii, lxxviii, lxxix, lxxx, lxxxi, lxxxii}.

Fármacos utilizados como primeira linha no tratamento da leishmaniose, antimoniais pentavalentes e miltefosina, induzem a morte celular de *Leishmania* via apoptose^{lxxxiii} e deste modo moléculas que atuam nesta via apresentam potencial terapêutico para as leishmanioses.

Em relação ao ciclo celular, o composto **48** induziu a paragem na fase G_0/G_1 do ciclo celular, com redução do número de células na fase S e G_2/M . Estes resultados indicam que o composto **48** altera o ciclo celular de *Leishmania infantum*, inibindo a proliferação dos promastigotas. Resultados anteriores demonstraram que o tratamento de parasitas *Leishmania* com o ácido ursólico afetava o seu ciclo celular. A paragem na fase G_0/G_1 do ciclo celular tem demonstrado ter um papel importante na morte induzida em protozoários como *Leishmania*^{lxxxiv}. Compostos como a camptotecina e triterpenóides como o ácido e ADHB também alteram o ciclo celular, com paragem na fase G_0/G_1 com inibição de topoisomerasas I e II presentes no ADN dos parasitas. Estas enzimas têm sido consideradas um importante alvo terapêutico em protozoários.

Nos parasitas de *Leishmania infantum*, o Ca^{2+} é mantido em níveis baixos e a estabilização desses níveis é crítica para a homeostase celular^{lxxxv, lxxxvi}. O derivado **48** induziu o aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico livre alterando o equilíbrio homeostático intracelular. Estes níveis elevados de cálcio observados em *Leishmania infantum* quando expostos ao composto **48** podem ser provenientes de compartimentos intracelulares de cálcio e da mitocôndria, uma vez que não há alteração da membrana plasmática. Estudos anteriores demonstraram que terpenóides exercem efeitos tóxicos em diversos sistemas biológicos, induzindo a libertação de iões cálcio armazenados intracelularmente e bloqueando os canais de cálcio culminando no desequilíbrio de Ca^{2+} citosólico nos parasitas^{lxxxvii}. A formação de acidocalcisomas, organitos de armazenamento em massa de Ca^{2+} , também está relacionada com alterações de concentração de cálcio. A observação das alterações dos organitos intracelulares de *Leishmania infantum* por microscopia eletrónica serão essenciais para a complementar os resultados deste estudo.

Existe uma estreita ligação entre o cálcio intracelular e o stress oxidativo em todos os organismos, incluindo *Leishmania infantum*^{lxxxviii, lxxxix}.

Ainda que as espécies reativas de oxigénio presentes em células normais desempenhem um importante papel como mensageiros de sinalização, a sua produção excessiva está ligada ao stress oxidativo, disfunções na mitocôndria e morte celular^{xc, xci}. Evidências destacam o papel das ROS no controlo da proliferação e diferenciação celular^{xcii, xciii}. O stress oxidativo pode interromper a translocação do cálcio entre os seus compartimentos (acidocalcisomas, mitocôndria, retículo endoplasmático)^{xciv}. Para concentrações elevadas de ROS, desencadeiam-se mecanismos de senescência e de morte apoptótica, afetando irreversivelmente componentes celulares de ADN, proteínas e lípidos do parasita^{xcv}.

Os estudos revelaram que o composto **48** originou espécies reativas de oxigênio, dependente da concentração. É possível que o aumento significativo de geração de ROS esteja associado ao fenómeno apoptótico.

Uma vez que o ácido ursólico induz morte celular programada associada à diminuição do potencial da membrana mitocondrial. Sendo esta uma das principais vias envolvidas no processo de apoptose e uma vez que os mecanismos de ação podem ser análogos, é importante avaliar o efeito do derivado **48** na atividade da mitocôndria (ATP, potencial da membrana mitocondrial).

Para além de alterações bioquímicas, a apoptose também induz alterações morfológicas. Assim, avaliou-se o tamanho das células. O composto induziu a diminuição do volume dos promastigotas, dependente da concentração. A partir do estudo em microscopia óptica de contraste de fases e microscopia óptica após coloração e Giemsa, conclui-se que o composto **48** induz alterações morfológicas como a diminuição do tamanho, forma mais arredondada e diminuição da mobilidade dos promastigotas de *Leishmania infantum*.

Em conclusão, o nosso estudo demonstrou os efeitos leishmanicidas do composto **48** contra as duas formas de *Leishmania infantum*, promastigotas e amastigotas intracelulares.

Adicionalmente, o composto **48** induziu a produção de ROS e aumento de Ca^{2+} intracelular e uma paragem no ciclo celular por retenção das células na fase G_0/G_1 , resultando em morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ⁱ Hide M., Bucheton B., Kamhawi S., Bras-Gonçalves R, Sundar S, et al. (2007) Understanding Human Leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology. John Wiley and Sons Inc 87-107.
- ⁱⁱ WHO (2016) Leishmaniasis. Fact sheet. Abril 2016. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/pt/>.
- ⁱⁱⁱ Bañuls A., Hide M.M Orugnonle F., *Leishmania* and the Leishmaniasis/A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans, Advances in Parasitology Vol 64, Elsevier Ltd. 2007.
- ^{iv} Shaw J: Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and their Implications. Mcm Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 471-478
- ^v Cortes, S., et al., Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. Infect Genet Evol, 2014. 26: p. 20-31.
- ^{vi} Pratlong, F., et al., Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. Parasitology, 2013. 140(4): p. 423-34.
- ^{vii} Dedet, J. P. and Pratlong, F. (2009). Leishmaniasis. In Manson's Tropical Diseases (ed. Cook, G.C. and Zumla, A.), pp. 1341–1365. 22nd Edn. Elsevier Science Limited, Saunders, London, UK.
- ^{viii} Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., Lopez-Vélez, R., Molina, R. & Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clinical Microbiology Reviews, 10, 298-319.
- ^{ix} Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, et al. (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J Clin Invest 118: 1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945.
- ^x Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr. Mol. Med. 4, 601–609.

^{xi} Sébastien Besteiro, Roderick A.M. Williams, Graham H. Coombs, Jeremy C. Mottram. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*.

^{xii} D. Sereno, E. Guilvard, S. Maquaire, M. Cavaleyra, P. Holzmuller, A. Ouaisi, J.L. Lemesre. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas.

^{xiii} Molecular biology of *Leishmania*.

^{xiv} Estefanía Calvo-Álvarez, Raquel Álvarez-Velilla, Maribel Jiménez, Ricardo Molina, Yolanda Pérez-Pertejo, Rafael Balaña-Fouce, Rosa M. Reguera; First Evidence of Intraclonal Genetic Exchange in Trypanosomatids Using Two *Leishmania infantum* Fluorescent Transgenic Clones, PLOS 2014

^{xv} Fidalgo L. M., Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids/ Targets and Drugs. 2011.

^{xvi} Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. J Biol Chem. 2004;279:11798–813.

^{xvii} Shapiro TA, Englund PT, The structure and replication of kinetoplast DNA, Annu Rev Microbiol. 1955, 49: 117-43.

^{xviii} Garnham, P.C., The genus *Leishmania*. Bull World Health Organ, 1971. 44(4): p. 477-89.

^{xix} Besteiro, S., et al., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. 37(10): p. 1063-75.

^{xx} Shapiro TA, Englund PT, The structure and replication of kinetoplast DNA, Annu Rev Microbiol. 1955, 49: 117-43.

- ^{xxi} Garnham, P.C., The genus *Leishmania*. Bull World Health Organ, 1971. 44(4): p. 477-89.
- ^{xxii} Besteiro, S., et al., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. 37(10): p. 1063-75.
- ^{xxiii} WHO, Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series, (949), xii-xiii, 1-186. 2010.
- ^{xxiv} Desjeux, P., Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. Med Microbiol Immunol, 2001. 190(1-2): p. 77-9.
- ^{xxv} Ready, Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol, 2014. 6: p. 147-54.
- ^{xxvi} Dawit, G., Z. Girma, and K. Simenew, A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol, 2013. 4: 166.
- ^{xxvii} Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A (1986) Blood finding strategy of a capillary - feeding sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Comp Biochem Physiol 83: 683–6.
- ^{xxviii} Turco SJ, Descoteaux A (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol 46: 65–94.
- ^{xxix} Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 321: 970–974.
- ^{xxx} Chang K-P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. Int. Rev. Cytol. 1983, 14, 267–305.
- ^{xxxi} Antoine, J-C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends Microbiol. 7, 1998, 392–401.
- ^{xxxii} Handman E, Bullen DV (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol 18: 332–334.

^{xxxiii} Sharma U., Singh S., Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control, J Vector Borne Dis. 2008, 255-72

^{xxxiv} Engwerda CR et al, Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. Am J Pathol 165: 2123-2133.

^{xxxv} Ribeiro JMC (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis 4: 143–152.

^{xxxvi} Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology 115: 359–369.

^{xxxvii} Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. J Med Entomol 42: 928–938.

^{xxxviii} Rogers ME, Chance ML, Bates PA, The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology 2002, 124: 495–507.

^{xxxix} Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, et al. (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 256: 1812–1815.

^{xl} Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol 33: 1027–1034.

^{xli} Rogers ME (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and

infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3: 223.

^{xlii} The cell biology of *Leishmania*/How to teach Using Animations.

^{xliii} Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician* 2004; 69(6): 1455-60.

^{xliv} Dutta, A., et al., Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*, 2005. 54(2): p. 119-22.

^{xlv} M. Machado, A.M. Dinis, M. Santos-Rosa, V. Alves, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M.C. Sousa, *Activity of Thymus capitellatus volatile extract, 1,8-cineole and borneol against Leishmania species*, Elsevier, 2014, p. 41-47

^{xlvi} Vanessa Kaplum, Juliana Cogo, Diego Pereira Sangi, Tânia Ueda-Nakamura, Arlene Gonçalves Corrêa, Celso Vataru Nakamura, *In vitro and in vivo activity of 2,3-diarylsubstituted quinoxaline derivatives in Leishmania amazonensis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016

^{xlvii} Manoj Kathuria, Arindam Bhattacharjee, Koeni V. Sashidhara, Suriya Pratap Singh and Kalyan Mitra "Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014

^{xlviii} Dolai S., Yadav R. K., Pal S. Adak S., Overexpression of Mitochondrial *Leishmania major* Ascorbate Peroxidase Enhances Tolerance to Oxidative Stress-Induced Programmed Cell Death and Protein Damage, *Eukaryotic Cell*, 2009, 1721-1731

^{xlix} Vânia Cristina Desoti, Danielle Lazarin-Bidóia, Fabianne Martins Ribeiro, Solange Cardoso Martins, Jean Henrique da Silva Rodrigues, Tania Ueda-Nakamura, Celso Vataru Nakamura, Valdecir Farias Ximenes, Sueli de Oliveira Silva "The Combination of Vitamin K3 and Vitamin C Has Synergic Activity against Forms of *Trypanosoma cruzi* through a Redox Imbalance Process

^l Rothe, G., Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry. *Cellular*

Diagnosics. Basis, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Eds.: Sack U., Tárnok A., Rothe G., Karger, Basel, 2009, 53-87.

^{li} Nunez, R., DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol*, 2001. 3(3): p. 67

^{lii} Ravi Hingorani, Jun Deng, Jeanne Elia, Catherine McIntyre, and Dev Mittar *Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerserTM System*, BD Biosciences, 2011, p. 1, 2

^{liii} Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1996;93:1624-1629

^{liv} S. L. Cro , S. Sundar, and A. H. Fairlamb, "Drug resistance in leishmaniasis," *Clinical Microbiology Review*, vol. 19, pp. 111–126, 2006.

^{lv} S. Natera, C. Machuca, M. Padrón-Nieves, A. Romero, E. Díaz, and A. Ponte-Sucre, "*Leishmania spp.*: proficiency of drug-resistant parasites," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 29, no. 6, pp. 637–642, 2007.

^{lvi} Balunas MJ, Kinghorn AD Drug discovery from medicinal plants, *Life Sci*. 2005 Dec 22; 78(5):431-41.

^{lvii} Natural products in the process of finding new drug candidates. Vuorelaa P, Leinonenb M, Saikkuc P, Tammela P, Rauhad JP, Wennberge T, Vuorela H, *Curr Med Chem*. 2004 Jun; 11(11):1375-89.

^{lviii} Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier JC, Gayral P, Dedet JP (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dollicarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother Res* 10: 1–4

^{lix} Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AD, Henriques AT, Bou-

Habib DC, Saraiva EMB (2001) Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1349–1354

^{lx} Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B (1999) Selective effect of 2',6'-di- hydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1234–1241

^{lxi} J. L. Sebaugh “Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation” *Pharmaceutical Statistics*, 2010, p. 128-134

^{lxii} Nur Tan^{a,b}, Macki Kaloga^a, Oliver A. Radtke^a, Albrecht F. Kiderlen^c, Sevil Öksüz^b, Ayhan Ulubelen^b, Herbert Kolodziej, *Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from Salvia cilicica and their antileishmanial activities*, Pergamon, 2002, p. 881-884

^{lxiii} Dutta, A., Mandal, G., Mandal, C., Chatterjee, M., 2007. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: a potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconjugate J.* 24, 81–86.

^{lxiv} Lakshmi, V., Pandey, K., Kapil, A., Singh, N., Samant, M., Dube, A., In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine* 2007;14, 36–42.

^{lxv} Nakayama, H., Desrivot, J., Bories, C., Franck, X., Figadère, B., Hocquemiller, R., 2007. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* 61, 186–188.

^{lxvi} Santin, M.R., Dos Santos, A.O., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Ferreira, I.C., Ueda-Nakamura, T., 2009. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 105, 1489–1496.

^{lxvii} Rondon, F.C., Bevilaqua, C.M., Accioly, M.P., Morais, S.M., Andrade-Júnior, H.F., Carvalho, C.A., Lima, J.C., Magalhães, H.C.R., 2012. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 185–191.

^{lxviii} Monzote, L., García, M., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. In vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. *Phytother. Res.* 21, 1055–1058.

^{lxix} Santos, A.O., Santin, A.C., Yamaguchi, M.U., Cortez, L.E., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P.,

Nakamura, C.V., 2010. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 475–483.

^{lxx} Moura do Carmo, D.F., Amaral, A.C., Machado, G.M., Leon, L.L., Silva, J.R., 2012. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of Piper species. *Molecules* 17, 1819–1829.

^{lxxi} Rondon, F.C., Bevilaqua, C.M., Accioly, M.P., Morais, S.M., Andrade-Junior, H.F., Machado, L.K., Cardoso, R.P., Almeida, C.A., Queiroz-Junior, E.M., Rodrigues, A.C., 2011. *In vitro* effect of Aloe vera, Coriandrum sativum and Ricinus communis fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Vet. Parasitol.* 178, 235–240.

^{lxxii} Seifert, K., Escobar, P., Croft, S.L., 2010. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 508–511.

^{lxxiii} Myler, Peter J.; Fasel, Nicolas; *Leishmania: After the genome*; Caister Academic Press, 2008, p. 123 - 127

^{lxxiv} Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., & Nakhasi, H. (2003a). **Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms.** *Int. J. Parasitol.*, 33(3), pp. 257-67.

^{lxxv} Eduardo S. Yamamoto, Bruno L. S. Campos, Luiz F. D. Passero; **The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Is Related to Programmed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis**, PLOS ONE 2015

^{lxxvi} Chowdhury AR, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D, et al. **Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in anti-leishmanial therapy.** *Mol Med* 2003; 9 : 26-36.

^{lxxvii} Prasad S, Yadav VR, Sung B, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB; Ursolic acid inhibits the growth of human pancreatic cancer and enhances the antitumor potential of gemcitabine in an orthotopic mouse model through suppression of the inflammatory microenvironment. 2016 *Oncotarget*

- ^{lxxviii} Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., Tokuda, H. & Ito, Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett* 30, 143–51 (1986).
- ^{lxxix} Liu, X. S. & Jiang, J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells. *Planta Med* 73, 1192–4 (2007).
- ^{lxxx} Manu, K. A. & Kuttan, G. **Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in BI6F-10 melanoma cells.** *Int Immunopharmacol* 8, 974–81 (2008).
- ^{lxxxi} Wang, J. S., Ren, T. N. & Xi, T. **Ursolic acid induces apoptosis by suppressing the expression of FoxM1 in MCF-7 human breast cancer cells.** *Med Oncol* 29, 10–5 (2012).
- ^{lxxxii} Achiwa, Y., Hasegawa, K., Komiya, T. & Udagawa, Y. **Ursolic acid induces Bax-dependent apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial cancer SNG-II cells.** *Oncol Rep* 13, 51–7 (2005).
- ^{lxxxiii} Chandrima Shaha, **Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis,** INDIAN J MED RES, 2006
- ^{lxxxiv} Sen, N., Bandyopadhyay, S., Dutta, A., Mandal, G., Ganguly, S., Saha, P., 2004. **Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellat *Leishmania dono- vani*.** *Cell Death Differ.* 11, 924–936.
- ^{lxxxv} Philosoph H, Zilberstein D 1989. **Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*.** *The Journal of Biological Chemistry* 1989 264: 10420–10424
- ^{lxxxvi} Richter C **Pro-oxidants and mitochondrial Ca²⁺: their relationship to apoptosis and oncogenesis.** *FEBS Letters* 1993 325:104–107

^{lxxxvii} Interaminense, L., Jucá, D., Magalhães, P., Leal-Cardoso, J., Duarte, G., & Lahlou, S.. **Pharmacological evidence of calcium-channel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats.** *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2007;21(5), pp. 497-506.

^{lxxxviii} Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C (2002). **Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes.** *Journal Biological Chemistry.* 277:24717–24722.

^{lxxxix} Dolai S, Pal S, Yadav RK, Adak S (2011). **Endoplasmic reticulum-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca^{2+} -dependent and caspase-independent mechanism.** *Journal Biological Chemistry* 286:13638–13646.

^{xc} Duchen MR. **Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death.** *Journal Physiology* 2000 529:57–68.

^{xci} Zong WX, Thompson CB. **Necrotic death as a cell fate.** *Genes Development* 2006 20:1–15. pmid:16391229

^{xcii} Droge, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiol. Rev.* 2002 82, 47–95

^{xciii} Theopold, U. **Developmental biology: a bad boy comes good.** *Nature* 2009 461, 486–487

^{xciv} Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. **Role of Ca^{2+} in toxic cell killing.** *Trends Pharmacological Sciences* 1989 10: 281–285.

^{xcv} Bidyottam Mittra and Norma W. Andrews; **Irony of fate: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation,** *Cell press*, p. 4

^{xcv} Hide M., Bucheton B., Kamhawi S., Bras-Gonçalves R, Sundar S, et al. (2007) Understanding Human Leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology. John Wiley and Sons Inc 87-107.

^{xcv} WHO (2016) Leishmaniasis. Fact sheet. Abril 2016. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/pt/>.

^{xcv} Bañuls A., Hide M.M Orugnolle F., *Leishmania* and the Leishmaniases/A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans, Advances in Parasitology Vol 64, Elsevier Ltd. 2007.

^{xcv} Shaw J:Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and their Implications. Mcm Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 47 1-478

^{xcv} Cortes, S., et al., Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. Infect Genet Evol, 2014. 26: p. 20-31.

^{xcv} Pratlong, F., et al., Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. Parasitology, 2013. 140(4): p. 423-34.

^{xcv} Dedet, J. P. and Pratlong, F. (2009). Leishmaniasis. In Manson's Tropical Diseases (ed. Cook, G.C. and Zumla, A.), pp. 1341–1365. 22nd Edn. Elsevier Science Limited, Saunders, London, UK.

^{xcv} Alvar, J., Canavate, C., Gutitérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., Lopez-Vélez, R., Molina, R. & Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clinical Microbiology Reviews, 10, 298-319.

^{xcv} Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, et al. (2008) Kinetoplastids: related

protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945.

^{xcv} Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609.

^{xcv} Sébastien Besteiro, Roderick A.M. Williams, Graham H. Coombs, Jeremy C. Mottram. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*.

^{xcv} D. Sereno, E. Guilvard, S. Maquaire, M. Cavaleyra, P. Holzmuller, A. Ouaisi, J.L. Lemesre. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas.

^{xcv} Estefanía Calvo-Álvarez, Raquel Álvarez-Velilla, Maribel Jiménez, Ricardo Molina, Yolanda Pérez-Pertejo, Rafael Balaña-Fouce, Rosa M. Reguera; First Evidence of Intraclonal Genetic Exchange in Trypanosomatids Using Two *Leishmania infantum* Fluorescent Transgenic Clones, PLOS 2014

^{xcv} Fidalgo L. M., Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids/ Targets and Drugs. 2011.

^{xcv} Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2004;279:11798–813.

^{xcv} Shapiro TA, Englund PT, The structure and replication of kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol.* 1955, 49: 117-43.

^{xcv} Garnham, P.C., The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ*, 1971. 44(4): p. 477-89.

^{xcv} Besteiro, S., et al., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 2007. 37(10): p. 1063-75.

^{xcv} Shapiro TA, Englund PT, The structure and replication of kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol.* 1955, 49: 117-43.

^{xcv} Gamham, P.C., The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ*, 1971. 44(4): p. 477-89.

^{xcv} Besteiro, S., et al., Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 2007. 37(10): p. 1063-75.

^{xcv} *Molecular biology of Leishmania.*

^{xcv} WHO, Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series, (949), xii-xiii, 1-186. 2010.

^{xcv} Desjeux, P., Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*, 2001. 190(1-2): p. 77-9.

^{xcv} Ready, Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, 2014. 6: p. 147-54.

^{xcv} Dawit, G., Z. Girma, and K. Simenew, A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J Bacteriol Parasitol*, 2013. 4: 166.

^{xcv} Ribeiro JM, Rossignol PA, Spielman A (1986) Blood finding strategy of a capillary - feeding sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Comp Biochem Physiol* 83: 683–6.

^{xcv} Turco SJ, Descoteaux A (1992) The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 46: 65–94.

^{xcv} Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970–974.

^{xcv} Chang K-P. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int. Rev. Cytol.* 1983, 14, 267–305.

^{xcv} Antoine, J.-C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 7, 1998, 392–401.

^{xcv} Handman E, Bullen DV (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332–334.

^{xcv} Sharma U., Singh S., Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control, *J Vector Borne Dis.* 2008, 255-72

^{xcv} Engwerda CR et al, Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol* 165: 2123-2133.

^{xcv} Ribeiro JMC (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143–152.

^{xcv} Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL (1997) A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359–369.

^{xcv} Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF (2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol* 42: 928–938.

^{xcv} Rogers ME, Chance ML, Bates PA, The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002, 124: 495–507.

^{xcv} Pimenta PF, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, et al. (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812–1815.

^{xcv} Gossage SM, Rogers ME, Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33: 1027–1034.

^{xcv} Rogers ME (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3: 223.

^{xcv} The cell biology of *Leishmania*/How to teach Using Animations.

^{xcv} Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician* 2004; 69(6): 1455-60.

^{xcv} Dutta, A., et al., Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*, 2005. 54(2): p. 119-22.

^{xcv} M. Machado, A.M. Dinis, M. Santos-Rosa, V. Alves, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M.C. Sousa, *Activity of Thymus capitellatus volatile extract, 1,8-cineole and borneol against Leishmania species*, Elsevier, 2014, p. 41-47

^{xcv} Vanessa Kaplum, Juliana Cogo, Diego Pereira Sangi, Tânia Ueda-Nakamura, Arlene Gonçalves Corrêa, Celso Vataru Nakamura, *In vitro and in vivo activity of 2,3-diarylsubstituted quinoxaline derivatives in Leishmania amazonensis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016

^{xcv} Manoj Kathuria, Arindam Bhattacharjee, Koneni V. Sashidhara, Suriya Pratap Singh and Kalyan Mitra "Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014

^{xcv} Dolai S., Yadav R. K., Pal S. Adak S., Overexpression of Mitochondrial *Leishmania major* Ascorbate Peroxidase Enhances Tolerance to Oxidative Stress-Induced Programmed Cell Death and Protein Damage, *Eukaryotic Cell*, 2009, 1721-1731

^{xcv} Vânia Cristina Desoti, Danielle Lazarin-Bidóia, Fabianne Martins Ribeiro, Solange Cardoso Martins, Jean Henrique da Silva Rodrigues, Tania Ueda-Nakamura, Celso Vataru Nakamura, Valdecir Farias Ximenes, Sueli de Oliveira Silva "The Combination of Vitamin K3 and Vitamin C Has Synergic Activity against Forms of Trypanosoma cruzi through a Redox Imbalance Process

^{xcv} Rothe, G., Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry. Cellular Diagnostics. Basis, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Eds.: Sack U., Tárnok A., Rothe G., Karger, Basel, 2009, 53-87.

^{xcv} Nunez, R., DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr Issues Mol Biol, 2001. 3(3): p. 67

^{xcv} Ravi Hingorani, Jun Deng, Jeanne Elia, Catherine McIntyre, and Dev Mittar *Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerserTM System*, BD Biosciences, 2011, p. 1, 2

^{xcv} Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schliessel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. Proc Nat Acad Sci USA. 1996;93:1624-1629

^{xcv} S. L. Cro , S. Sundar, and A. H. Fairlamb, "Drug resistance in leishmaniasis," Clinical Microbiology Review, vol. 19, pp. 111–126, 2006.

^{xcv} S. Natera, C. Machuca, M. Padrón-Nieves, A. Romero, E. Díaz, and A. Ponte-Sucre, "Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites," International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 29, no. 6, pp. 637–642, 2007.

^{xcv} Balunas MJ, Kinghorn AD Drug discovery from medicinal plants, Life Sci. 2005 Dec 22; 78(5):431-41.

^{xcv} Natural products in the process of finding new drug candidates. Vuorelaa P, Leinonenb M, Saikkuc P, Tammela P, Rauhad JP, Wennberge T, Vuorela H, Curr Med Chem. 2004 Jun; 11(11):1375-89.

- ^{xcv} Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier JC, Gayral P, Dedet JP (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliosarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother Res* 10: 1–4
- ^{xcv} Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AD, Henriques AT, Bou-Habib DC, Saraiva EMB (2001) Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1349–1354
- ^{xcv} Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B (1999) Selective effect of 2',6'-di-hydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1234–1241
- ^{xcv} J. L. Sebaugh "Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation" *Pharmaceutical Statistics*, 2010, p. 128-134
- ^{xcv} Nur Tan^{a,b}, Macki Kaloga^a, Oliver A. Radtke^a, Albrecht F. Kiderlen^c, Sevil Öksüz^b, Ayhan Ulubelen^b, Herbert Kolodziej, *Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from Salvia cilicica and their antileishmanial activities*, Pergamon, 2002, p. 881-884
- ^{xcv} Dutta, A., Mandal, G., Mandal, C., Chatterjee, M., 2007. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: a potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconjugate J.* 24, 81–86.
- ^{xcv} Lakshmi, V., Pandey, K., Kapil, A., Singh, N., Samant, M., Dube, A., In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine* 2007;14, 36–42.
- ^{xcv} Nakayama, H., Desrivot, J., Bories, C., Franck, X., Figadère, B., Hocquemiller, R., 2007. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* 61, 186–188.
- ^{xcv} Santin, M.R., Dos Santos, A.O., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Ferreira, I.C., Ueda-Nakamura, T., 2009. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 105, 1489–1496.
- ^{xcv} Rondon, F.C., Bevilaqua, C.M., Accioly, M.P., Morais, S.M., Andrade-Júnior, H.F., Carvalho, C.A.,

Lima, J.C., Magalhães, H.C.R., 2012. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 185–191.

^{xcv} Monzote, L., García, M., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. In vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. Phytother. Res. 21, 1055–1058.

^{xcv} Santos, A.O., Santin, A.C., Yamaguchi, M.U., Cortez, L.E., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Nakamura, C.V., 2010. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 104, 475–483.

^{xcv} Moura do Carmo, D.F., Amaral, A.C., Machado, G.M., Leon, L.L., Silva, J.R., 2012. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of Piper species. Molecules 17, 1819–1829.

^{xcv} Rondon, F.C., Bevilaqua, C.M., Accioly, M.P., Morais, S.M., Andrade-Junior, H.F., Machado, L.K., Cardoso, R.P., Almeida, C.A., Queiroz-Junior, E.M., Rodrigues, A.C., 2011. In vitro effect of Aloe vera, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. Vet. Parasitol. 178, 235–240.

^{xcv} Seifert, K., Escobar, P., Croft, S.L., 2010. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. J. Antimicrob. Chemother. 65, 508–511.

^{xcv} Myler, Peter J.; Fasel, Nicolas; *Leishmania: After the genome*; Caister Academic Press, 2008, p. 123 - 127

^{xcv} Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., & Nakhasi, H. (2003a). **Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms**. Int. J. Parasitol., 33(3), pp. 257-67.

^{xcv} Eduardo S. Yamamoto, Bruno L. S. Campos, Luiz F. D. Passero; **The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis**, PLOS ONE 2015

^{xcv} Chowdhury AR, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D, et al. **Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in anti-leishmanial therapy**. Mol Med 2003; 9 : 26-36.

^{xcv} Prasad S, Yadav VR, Sung B, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB; Ursolic acid inhibits the growth of human pancreatic cancer and enhances the antitumor potential of gemcitabine in an orthotopic mouse model through suppression of the inflammatory microenvironment. 2016 Oncotarget

^{xcv} Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., Tokuda, H. & Ito, Y. Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation; ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett* 30, 143–51 (1986).

^{xcv} Liu, X. S. & Jiang, J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells. *Planta Med* 73, 1192–4 (2007).

^{xcv} Manu, K. A. & Kuttan, G. **Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells.** *Int Immunopharmacol* 8, 974–81 (2008).

^{xcv} Wang, J. S., Ren, T. N. & Xi, T. **Ursolic acid induces apoptosis by suppressing the expression of FoxM1 in MCF-7 human breast cancer cells.** *Med Oncol* 29, 10–5 (2012).

^{xcv} Achiwa, Y., Hasegawa, K., Komiya, T. & Udagawa, Y. **Ursolic acid induces Bax-dependent apoptosis through the caspase-3 pathway in endometrial cancer SNG-II cells.** *Oncol Rep* 13, 51–7 (2005).

^{xcv} Chandrima Shaha, **Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis,** *INDIAN J MED RES*, 2006

^{xcv} Sen, N., Bandyopadhyay, S., Dutta, A., Mandal, G., Ganguly, S., Saha, P., 2004. **Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellat *Leishmania dono- vani*.** *Cell Death Differ.* 11, 924–936.

^{xcv} Philosoph H, Zilberstein D 1989. **Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani***. The Journal of Biological Chemistry 1989 264: 10420–10424

^{xcv} Richter C **Pro-oxidants and mitochondrial Ca^{2+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis**. FEBS Letters 1993 325:104–107

^{xcv} Interaminense, L., Jucá, D., Magalhães, P., Leal-Cardoso, J., Duarte, G., & Lahlou, S.. **Pharmacological evidence of calcium-channel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats**. Fundam. Clin. Pharmacol., 2007;21(5), pp. 497-506.

^{xcv} Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C (2002). **Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes**. Journal Biological Chemistry. 277:24717–24272.

^{xcv} Dolai S, Pal S, Yadav RK, Adak S (2011). **Endoplasmic reticulum-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca^{2+} -dependent and caspase-independent mechanism**. Journal Biological Chemistry 286:13638–13646.

^{xcv} Duchen MR. **Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death**. Journal Physiology 2000 529:57–68.

^{xcv} Zong WX, Thompson CB. **Necrotic death as a cell fate**. Genes Development 2006 20:1–15. pmid:16391229

^{xcv} Droge, W. **Free radicals in the physiological control of cell function**. Physiol. Rev. 2002 82, 47–95

^{xcv} Theopold, U. **Developmental biology: a bad boy comes good**. Nature 2009 461, 486–487

^{xcv} Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. **Role of Ca^{2+} in toxic cell killing**. Trends Pharmacological Sciences 1989 10: 281–285.

^{xcv} Bidyottam Mitra and Norma W. Andrews; **Irony of fate: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation**, Cell press, p. 4