



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Atividade anti-*Leishmania* de derivados semissintéticos dos triterpenóides betulina e ácido betulínico

Raquel Rosa Varandas

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Atividade anti-*Leishmania* de derivados semissintéticos dos triterpenóides betulina e ácido betulínico

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição (Universidade de Coimbra).

Raquel Rosa Varandas

2012

Agradecimentos

Pelo contributo direto ou indireto para a realização desta tese de mestrado manifesto o meu agradecimento:

À orientadora, Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, por todos os conhecimentos transmitidos, pelo empenho, paciência, simpatia, amizade e sorriso com que sempre me presenteou.

À coorientadora, Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição pelo apoio, total disponibilidade e ajuda que sempre me prestou.

Ao Professor Doutor Jorge Salvador por todo o apoio e disponibilidade para as questões que foram aparecendo.

Às minhas colegas, Sonya Costa, Sara Ferrari e Manuela Ghilotti pela amizade, ajuda e companheirismo, sem elas o laboratório não seria a mesma coisa.

A toda a equipa dos laboratórios de Microbiologia e Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela simpatia e ajuda prestada sempre que a solicitei.

A todos os familiares, amigos e colegas, pela amizade e empenho, estando sempre presentes quando precisei.

Ao Eduardo, pelo carinho e incentivo, pela paciência e imensa compreensão e por estar sempre do meu lado.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e carinho demonstrados, pelo incentivo e compreensão, por estarem sempre presentes e pelas sábias palavras nos momentos mais difíceis. Sem eles nada disto teria sido possível.

A todos, um grande Obrigada!

Índice

Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas	VI
Abreviaturas	VII
Resumo	VIII
Abstract	X
Capítulo 1 – Introdução	3
1.1 – Nomenclatura e Taxonomia de <i>Leishmania</i>	3
1.2 – Morfologia e ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	5
1.3 – Leishmanioses	12
1.3.1 – Fisiopatologia	12
1.3.1.1 – Leishmaniose visceral	12
1.3.1.2 – Leishmaniose cutânea	13
1.3.1.3 – Leishmaniose mucocutânea	14
1.3.2 – Epidemiologia	15
1.3.3 – Tratamento	19
1.3.3.1 – Novas abordagens para a terapêutica da leishmaniose...	21
Capítulo 2 – Objetivos	27
Capítulo 3 – Material e Métodos	31
3.1 – Compostos	31
3.2 – Origem e cultura de <i>Leishmania</i>	32
3.3 – Estudos de viabilidade celular	32
3.4 – Estudo da combinação entre os derivados da betulina e do ácido betulínico e a miltefosina	33
3.5 – Estudo morfológico por microscopia ótica	34
3.6 – Estudo da integridade do ADN	35

3.7 – Citometria de fluxo	36
3.7.1 – Estudo do ciclo celular	36
3.7.2 – Estudo da apoptose e necrose	37
3.8 – Citotoxicidade em células de mamíferos	38
3.9 – Análise estatística	38
Capítulo 4 – Resultados	41
4.1 – Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados da betulina e do ácido betulínico	41
4.2 – Determinação dos valores de CI ₅₀	42
4.3 – Combinação entre os derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico ABB13 e a miltefosina	43
4.4 – Alterações morfológicas observadas em microscopia ótica	49
4.5 – Estudo da integridade do ADN	52
4.6 – Paragem do ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i> na fase G0/G1	53
4.7 – Estudo da apoptose/necrose	54
4.8 – Citotoxicidade em células de mamífero	55
Capítulo 5 – Discussão	59
Capítulo 6 – Conclusão	65
Referências Bibliográficas	69
Anexo I	83

Índice de Figuras

Figura 1	Classificação taxonómica das espécies de <i>Leishmania</i>	4
Figura 2	Representação esquemática da estrutura das formas promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i>	5
Figura 3	Insetos da subfamília Phlebotominae que atuam como vetores transmissores do parasita <i>Leishmania</i>	6
Figura 4	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	7
Figura 5	Localização das promastigotas de <i>Leishmania</i> no inseto vetor	8
Figura 6	Ciclos epidemiológicos de <i>Leishmania infantum</i>	9
Figura 7	Distribuição das espécies <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i> nos países europeus até ao ano 2009	11
Figura 8	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral	16
Figura 9	Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea	16
Figura 10	Distribuição mundial da leishmaniose e de países que identificaram coinfeção <i>Leishmania</i> /VIH até 2001	18
Figura 11	Estrutura química da Betulina e do Ácido Betulínico	22
Figura 12	Isoblograma da associação de dois compostos (A e B)	34
Figura 13	Efeito dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	41
Figura 14	Efeito dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	42
Figura 15	Efeito dos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13), isolados ou em combinação com miltefosina, na inibição da viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	44
Figura 16	Comparação dos efeitos das combinações entre BT06 e miltefosina com os de BT06 isolado e da miltefosina isolada	45
Figura 17	Comparação dos efeitos das combinações entre AB13 e miltefosina com os de AB13 isolado e com os da miltefosina isolada	46
Figura 18	Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) dos derivados BT06 e AB13, isolados ou em combinação com miltefosina	47
Figura 19	Análise isoblográfica da combinação BT06 e miltefosina	48
Figura 20	Análise isoblográfica da combinação AB13 e miltefosina	48

Figura 21	Observação por microscopia ótica das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> na ausência e presença do derivado da betulina BT06	50
Figura 22	Observação por microscopia ótica das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> na ausência e presença do derivado do ácido betulínico AB13	51
Figura 23	Eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos ADNs genômicos de promastigotas de <i>L. infantum</i> após tratamento com os derivados BT06 e AB13 na respectiva concentração CI_{50}	52
Figura 24	Histogramas representativos do conteúdo de ADN das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> expostas aos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13)	54
Figura 25	Citotoxicidade dos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13) em macrófagos (RAW 264.7)	55

Índice de Tabelas

Tabela I	Espécies de <i>Leishmania</i> e as respectivas manifestações clínicas no homem, reservatórios e distribuição geográfica	10
Tabela II	Fármacos usados na terapêutica da leishmaniose visceral	20
Tabela III	Nomenclatura dos derivados da betulina e do ácido betulínico aprovada pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC)	31
Tabela IV	Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) dos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	43
Tabela V	Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) dos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 associados com a miltefosina em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	47
Tabela VI	Efeitos dos derivados BT06 e AB13 nas concentrações CI ₅₀ no ciclo celular de <i>Leishmania infantum</i> , ao longo do tempo de incubação	53
Tabela VII	Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> marcadas com anexina-V e IP após exposição aos derivados BT06 e AB13 nas concentrações CI ₅₀ , ao longo do tempo de incubação	55

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albumina de soro bovino
Cdk	Cinases dependentes de ciclinas
CI₅₀	Concentração inibitória a 50%
DMEM	Meio de Earle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HePC	Hexadecilfosfolina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico
IP	Iodeto de propídio
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC	Leishmaniose cutânea
LCan	Leishmaniose canina
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea local
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MAPKs	Cinases de proteínas ativadas por agentes mitogénicos
MON-1	Monpellier-1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PKDL	Leishmaniose dermal pós- <i>Kala azar</i> (post ' <i>Kala azar</i> ' dermal leishmaniasis)
PS	Fosfatidilserina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
SEM	Erro padrão da média
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TBE	Tris-borato-EDTA
VIH	Vírus da Imunodeficiência humana
WHO	World Health Organization

Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária causada pelos protozoários do género *Leishmania*. Esta doença é endémica em 98 países, afetando mais de 12 milhões de pessoas e ameaçando 350 milhões em todo o mundo. Nos últimos anos tem ocorrido uma emergência de leishmaniose em países desenvolvidos devido à coinfeção com VIH. Existem dois ciclos epidemiológicos principais, o zoonótico em que os animais atuam como reservatórios e o antroponótico em que o homem é a única fonte de infeção para o vetor. As espécies de *Leishmania* durante o ciclo de vida apresentam duas formas principais, morfologicamente distintas: a forma promastigota no inseto vetor e amastigota no sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro mamífero. Dependendo da espécie infetante, da resposta imune do hospedeiro e da interação entre o parasita e o hospedeiro, a manifestação da doença pode apresentar-se com três formas clínicas: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea. Na Europa ocorrem dois ciclos de transmissão, a leishmaniose visceral e cutânea zoonótica causada por *L. infantum* e a leishmaniose cutânea antroponótica causada por *L. tropica*. A terapêutica é essencial no controlo desta infeção, especialmente na leishmaniose visceral em que a ausência de tratamento leva à morte. Os fármacos atualmente existentes são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina, entre outros. No entanto, todos estes medicamentos possuem limitações devido a sérios efeitos secundários, elevada toxicidade, desenvolvimento de resistência, longa duração de tratamento e elevados custos.

É, assim, urgente a procura e o desenvolvimento de novas moléculas com atividade anti-*Leishmania* de forma a promover alternativas terapêuticas para a leishmaniose.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade anti-*Leishmania* de 16 derivados semissintéticos da betulina (BT01-BT09) e do ácido betulínico (AB10-AB16). Esta atividade foi avaliada pela viabilidade celular recorrendo ao teste do MTT. Todos os derivados, à exceção de AB12, apresentaram atividade anti-*Leishmania*. No entanto, apenas se obteve valores de inibição a 50% (CI₅₀) para o derivado da betulina BT06 (50,8 µM) e o derivado do ácido betulínico AB13 (25,8 µM).

Para os derivados mais ativos, BT06 e AB13, avaliou-se a natureza das combinações com a miltefosina. Através da análise isobolográfica foi possível verificar que as associações foram sinérgicas, sendo a combinação AB13 e miltefosina a mais

eficaz. As vantagens da terapêutica combinada incluem o aumento da eficácia das drogas, diminuição da dosagem, diminuição da toxicidade e um atraso ou prevenção do aparecimento de resistência ao fármaco. Neste sentido, os derivados BT06 e AB13 representam moléculas promissoras a aplicar na terapêutica combinada com a miltefosina.

Com o objetivo de elucidar mecanismos responsáveis pela atividade biológica dos derivados BT06 e AB13 foram realizados estudos morfológicos, avaliação da morte celular por apoptose/necrose e avaliação do ciclo celular. O estudo morfológico foi efetuado por microscopia ótica de contraste de fases e após coloração de Giemsa. Nas promastigotas submetidas ao tratamento por BT06 não se observaram efeitos significativos. No entanto, as promastigotas expostas ao AB13 sofreram alterações morfológicas significativas em relação ao controlo, nomeadamente perda da forma fusiforme, tornando-se mais pequenas e redondas, e perda de mobilidade. A morte celular por apoptose/necrose foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com Anexina-V/IP, e pelo estudo da integridade do ADN. As células tratadas com os derivados BT06 e AB13 não apresentaram morte significativa por apoptose/necrose. A distribuição das promastigotas pelo ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio. Ambos os derivados promoveram a retenção das promastigotas de *L. infantum* na fase G0/G1 do ciclo celular, sugerindo uma paragem do ciclo nesta fase. A inibição da proliferação celular parece representar um dos principais mecanismos de ação dos derivados da betulina e do ácido betulínico.

Tendo em consideração os novos alvos terapêuticos referenciados em *Leishmania*, a atividade antitumoral dos derivados BT06 e AB13, previamente observada em células cancerígenas, e os resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que as cinases dependentes de ciclinas e as topoisomerasas de ADN possam representar potenciais alvos moleculares dos derivados BT06 e AB13.

Adicionalmente, os derivados BT06 e AB13 não induziram morte em linhas celulares de macrófagos e portanto não apresentarão riscos de toxicidade para o hospedeiro.

Em conclusão, este trabalho permitiu identificar o derivado da betulina BT06 e o derivado do ácido betulínico AB13 como moléculas ativas em *Leishmania infantum*. O derivado AB13 foi o mais eficaz, representando uma molécula promissora a aplicar no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas da leishmaniose.

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoans of the *Leishmania* genus. This disease is endemic in 98 countries, affecting over 12 million people and threatening 350 million worldwide. In recent years there has been an emergence of leishmaniasis in developed countries due to coinfection in individuals with HIV.

There are two main epidemiological cycles, the zoonotic where animals act as reservoirs and anthroponotic where man is the only source of infection for the vector. *Leishmania* species, during the cell cycle, exhibit two main forms, morphologically distinct: promastigote in the insect vector and amastigote in the mononuclear phagocyte system of the mammalian host. Depending on the infective species, the host immune response and the interaction between the parasite and host, the disease can be manifested in three clinical forms: visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In Europe there are two transmission cycles, zoonotic visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *L. infantum* and anthroponotic cutaneous leishmaniasis caused by *L. tropica*.

The therapy is essential for infection control, especially for visceral leishmaniasis where the absence of treatment leads to death. The drugs currently available are the pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidine and miltefosine, among others. However, all these drugs have limitations due to serious side effects, high toxicity, development of resistance, long treatment duration and high cost. It's then crucial to find and develop new molecules with anti-*Leishmania* activity to promote potential treatments for leishmaniasis.

Thus, the purpose of this study was to evaluate the anti-*Leishmania* activity of 16 semisynthetic derivatives of betulin (BT01 to BT09) and betulinic acid (AB10 to AB16). This activity was assessed by cell viability using the MTT test. All derivatives, except AB12, showed anti-*Leishmania* activity. However, only for the betulin derivative BT06 (50.8 μM) and AB13 derivative of betulinic acid (25.8 μM) was possible to obtain 50% inhibition (IC_{50}) values.

For the most active derivatives, BT06 and AB13, an evaluation of the combination potential with miltefosine was followed. Through the isobologram was possible to verify that all combinations were synergistic, being the combination AB13 and miltefosine the most effective. The benefits of combination therapy include increase

in drug efficacy, reduction of dosage, decrease of toxicity and a delay or prevention of drug resistance. Therefore, the derivative BT06 and AB13 seem to be promising molecules for the combination therapy of leishmaniasis, namely with miltefosine.

Morphological studies, evaluation of cell death by apoptosis/necrosis and evaluation of the cell cycle were also performed to clarify the mechanisms responsible for the biological activity of the BT06 and AB13 derivatives.

The morphological study was executed by phase contrast optical microscopy and after Giemsa stain. There were no significant changes in promastigotes submitted to BT06 treatment. However, promastigotes exposed to AB13 showed significant morphological changes comparing with the control, namely loss of the fusiform shape become smaller and rounder, and loss of mobility.

Cell death by apoptosis/necrosis was evaluated by flow cytometry, through Annexin-V/PI labelling and DNA integrity. Cells treated with BT06 and AB13 derivatives didn't show significant death by apoptosis/necrosis.

The distribution of promastigotes in the cell cycle was assessed by flow cytometry after propidium iodide staining. Both derivatives promoted the retention of *L. infantum* promastigotes in G0/G1 phase, suggesting an arrest of the cycle at this stage. So, the cell proliferation inhibition seems to be the main mechanism of biological activity.

Considering the potential therapeutic targets in *Leishmania*, the previously antitumoral activity of AB13 and BT06 derivatives and the obtained results in this study, we suggested that DNA topoisomerases and cyclin dependent kinases seems to be potential targets of BT06 and AB13 derivatives.

Moreover, these derivatives didn't induce death in macrophage cell lines and therefore don't present risk of toxicity for the host.

In conclusion, this study identified the betulin derivative BT06 and the betulinic acid derivative AB13 as active molecules in *Leishmania infantum*. The derivative AB13 was the most effective, representing a promising molecule to the development of new alternative therapies for leishmaniasis.

Capítulo 1
Introdução

1 – Introdução

A leishmaniose é uma doença provocada pelo parasita protozoário *Leishmania*. Esta afeta mundialmente cerca de 12 milhões de pessoas em 98 países, estando em risco mais de 350 milhões. Um dos problemas emergentes é a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana. É, assim, considerada pela Organização Mundial de Saúde, como uma das principais doenças tropicais devido à sua prevalência e elevada taxa de mortalidade (WHO, 2010). Esta parasitose classifica-se em três formas principais que diferem no padrão e manifestação clínica da doença: leishmaniose visceral com uma taxa de mortalidade perto dos 100% para casos não tratados, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea. A transmissão do parasita ao hospedeiro mamífero ocorre através da picada de um mosquito, o flebótomo (Croft & Coombs, 2003; Bates, 2006). O tratamento atualmente disponível é limitado devido à baixa eficácia e presença de toxicidade.

1.1 – Nomenclatura e Taxonomia de *Leishmania*

O género *Leishmania* foi descrito pela primeira vez em 1903 por Leishman e Donovan (Herwaldt, 1999) e segundo Levine e colaboradores (1980) pertence ao Reino Protista, sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, sub-Filo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, sub-Ordem Trypanosomatina e Família Trypanosomatidae. No entanto, uma classificação mais recente considera a família Trypanosomatidae no filo Euglenozoa, classe Kinetoplastia e ordem Trypanosomatida (Moreira *et al.*, 2004)

Devido à similaridade morfológica entre as espécies de *Leishmania* foi necessária a adoção de outros critérios de classificação, nomeadamente fatores extrínsecos tais como a distribuição geográfica, os padrões clínicos, os reservatórios, os vetores e os ciclos de vida. Mais recentemente, adotaram-se métodos de classificação baseados em fatores intrínsecos do parasita em que a tipagem isoenzimática é o método de identificação mais utilizado e aceite. Isoenzimas são consideradas diferentes formas alélicas de um gene e a variação enzimática num determinado *locus* pode ser interpretada como uma mutação que ocorreu durante a evolução. Assim, este método analisa as isoenzimas por eletroforese (eletroforese enzimática *multilocus*) permitindo

agrupar as estirpes, com perfis isoenzimáticos idênticos, em unidades taxonômicas operacionais designadas por zimodemos (Shaw, 1994).

O sistema atual de classificação das espécies do género *Leishmania* baseia-se nas características clínicas e epidemiológicas, apoiada por aspetos biológicos, bioquímicos e moleculares (Fig. 1) (WHO, 2010).

Existem dois subgéneros, *Leishmania* e *Viannia*. O subgénero *Leishmania* engloba as espécies *L. infantum/chagasi*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis*. O subgénero *Viannia* comporta as espécies *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*.

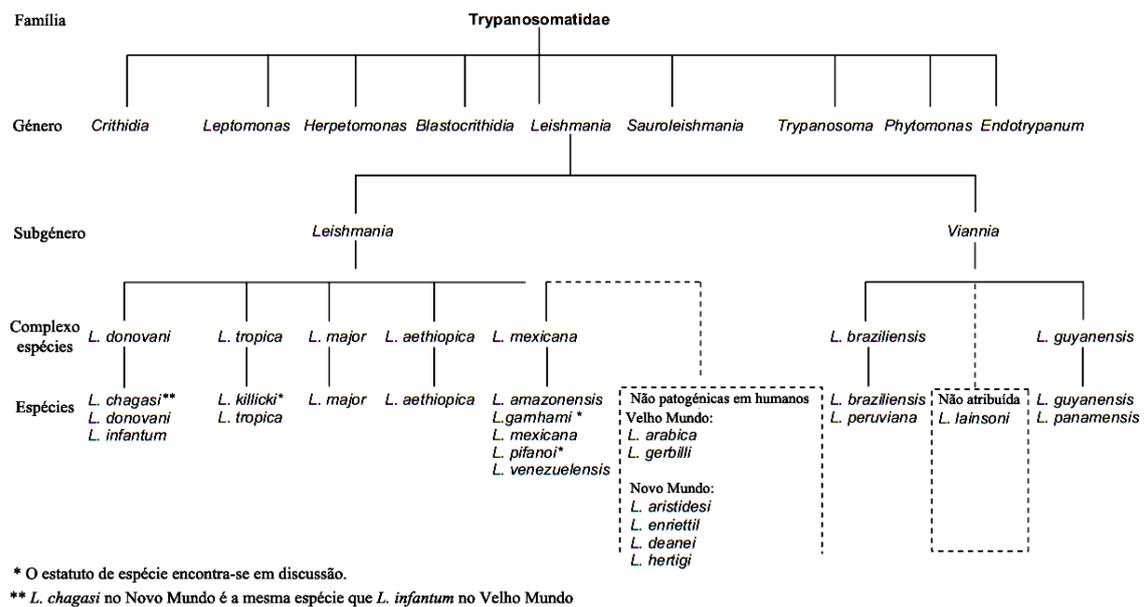


Figura 1 - Classificação taxonômica das espécies de *Leishmania* (Adaptado de WHO, 2010).

As espécies de *Leishmania* presentes na Europa são *L. infantum* e *L. tropica* (Ready, 2010). O zimodemo *L. infantum* MON-1 (de Montpellier) é o mais predominante nos países mediterrânicos (Pratlong *et al.*, 2004) e é encontrado tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunodeficientes. Esta predominância foi confirmada por Campino e colaboradores (2006) em Portugal, onde o zimodemo *L. infantum* MON-1 foi detetado em infeções humanas, caninas e de outros hospedeiros selvagens. Assim, é considerado o principal agente etiológico responsável pelos casos de leishmanioses cutânea e visceral humanas em Portugal, em que o cão é o principal reservatório.

1.2 – Morfologia e ciclo de vida de *Leishmania*

Os parasitas do género *Leishmania* possuem dois estádios principais, morfologicamente distintos, promastigota e amastigota (Fig. 2). Ambos os estádios possuem núcleo, retículo endoplasmático, glicossomas, acidocalcissomas, bolsa flagelar, uma mitocôndria e cinetoplasto com ADN mitocondrial (kADN) (Simpson *et al.*, 1987; Kazemi, 2011).

As promastigotas são de maiores dimensões e alongadas, com um comprimento de 15 a 30 µm por 2 a 3 µm de largura. Contêm um núcleo central, um cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo longo e livre. O flagelo é funcional e projeta-se da bolsa flagelar, estendendo-se para além do corpo celular, tornando os parasitas neste estágio formas muito ativas e móveis. As promastigotas encontram-se nos hospedeiros invertebrados que funcionam como os vetores biológicos.

As amastigotas são células ovoides com 2 a 6 µm do eixo principal. Possuem um núcleo central, um cinetoplasto e um flagelo não funcional, não se projetando para fora do corpo celular e cuja base se origina na bolsa flagelar. Encontram-se nos mamíferos, os hospedeiros vertebrados (Dedet *et al.*, 1999).

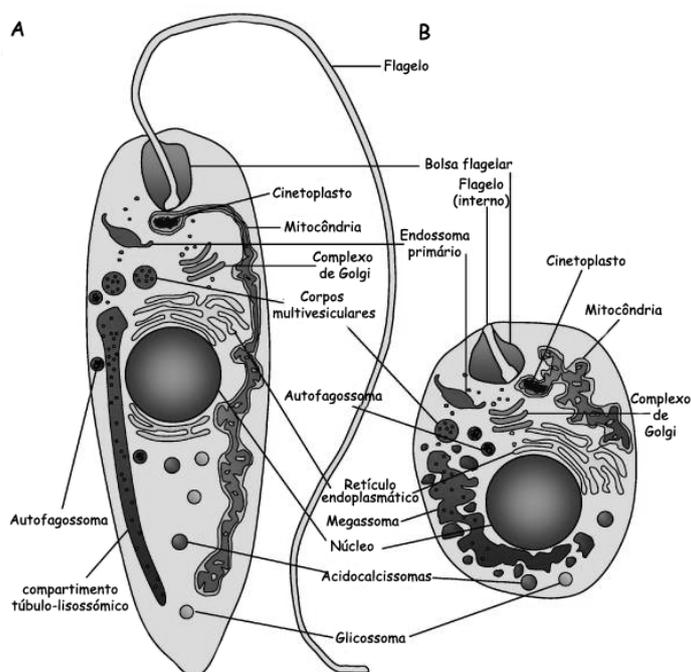


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura das formas promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania* (Adaptado de Besteiro *et al.*, 2007).

Os vetores são pequenos insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, comumente designados por flebótomos (ou moscas da areia), dos géneros *Phlebotomus* em África e Eurásia (Velho Mundo) e *Lutzomyia* nas Américas (Novo Mundo). Os flebótomos possuem uma larga distribuição nos climas quentes e temperados, estando descritas cerca de 600 espécies. No entanto, apenas 30 das espécies conhecidas de flebótomos são importantes vetores da doença (Sharma & Singh, 2008). Em Portugal, as espécies existentes são *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Campino *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2009).

Estes insetos encontram-se mais ativos desde o anoitecer até ao amanhecer e têm como locais de repouso e oviposição zonas onde existe matéria orgânica em abundância (Desjeux, 2001). Apenas a fêmea é hematófaga, obtendo no sangue as proteínas necessárias ao desenvolvimento dos ovos, e por isso só ela transmite o parasita aos hospedeiros vertebrados (Killick-Kendrick, 1990; Bates, 2007; Sharma & Singh, 2008).

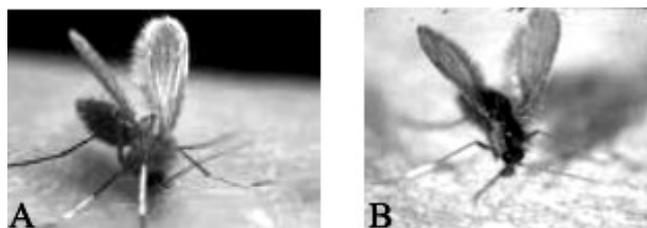


Figura 3 – Insetos da subfamília Phlebotominae que atuam como vetores transmissores do parasita *Leishmania*. (A) *Phlebotomus argentipes*; (B) *Lutzomyia longipalpis* (Sharma & Singh, 2008).

O ciclo de vida do parasita (Fig. 4) inicia-se quando o inseto vetor injeta, através da sua probóscide promastigotas metacíclicas de *Leishmania* na pele do hospedeiro durante a refeição sanguínea (Bates, 2007). Rapidamente após a entrada na pele, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e outras células mononucleares fagocíticas existentes na pele. Nos fagolisossomas as promastigotas transformam-se no estágio amastigota (McConville *et al.*, 2007). O ambiente nos fagolisossomas não é favorável à maioria dos organismos mas as amastigotas encontram-se adaptadas ao ambiente ácido, elevada temperatura (37°C) e à presença das enzimas lisossomais, diferente do pH neutro e temperatura ambiente no qual as promastigotas se desenvolvem (Zilberstein & Shapira, 1994). Os parasitas neste estágio são preferencialmente intracelulares infetando as células do sistema mononuclear

fagocitário (SMF), como os macrófagos e órgãos ricos em macrófagos (fígado, baço, medula óssea, pele e nódulos linfáticos).

Após a transformação, as amastigotas multiplicam-se por divisão simples dentro dos macrófagos até que estes sofrem ruptura da membrana libertando as amastigotas que são posteriormente fagocitadas por outros macrófagos (Bates, 2006). Esta fase é crônica e pode continuar durante meses a anos ou até por toda a vida sem que apareçam visíveis sinais ou sintomas, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro e do seu sistema imunitário. As 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 (Engwerda *et al.*, 2004; Sharma & Singh, 2008).

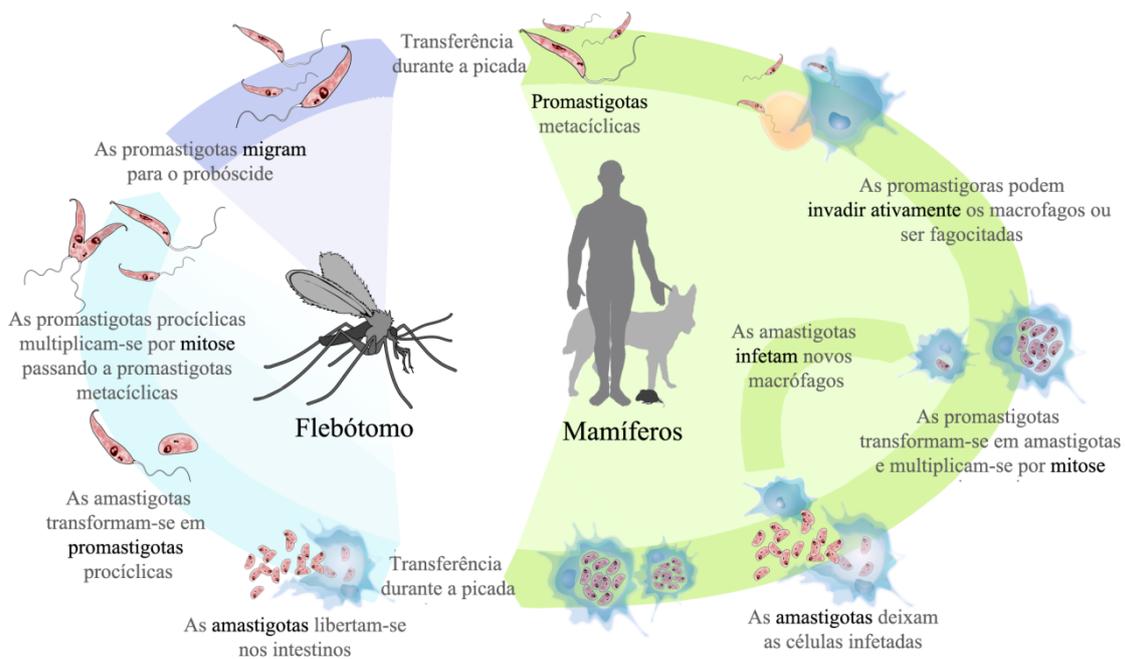


Figura 4 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de <http://commons.wikimedia.org/wiki/User:LadyofHats/gallery2>).

Os flebótomos durante a refeição sanguínea ingerem células infectadas com o parasita, existentes na pele ou no sangue periférico. Dentro do vetor, as amastigotas sofrem uma série de alterações até diferenciarem-se nas formas infetantes para os mamíferos, as promastigotas metacíclicas (Gossage *et al.*, 2003). Assim, as amastigotas ingeridas pelo flebótomo rapidamente se transformam em promastigotas procíclicas no

intestino médio do vetor, onde se encontram envolvidas pela membrana peritrófica, estrutura que protege o epitélio intestinal do inseto dos agentes infecciosos e outras estruturas presentes no sangue ingerido (Kamhawi, 2006). As promastigotas procíclicas transformam-se em promastigotas nectomonadais, altura em que a membrana peritrófica se começa a desintegrar. Estas formas desenvolvem-se e acumulam-se em diferentes partes do intestino do inseto consoante o subgénero. Assim, no caso do subgénero *Viannia* encontram-se no intestino posterior, e no subgénero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino médio. As promastigotas nectomonadais encontram-se ligadas às células epiteliais do intestino de forma a evitar a sua expulsão com o resto da refeição sanguínea e reproduzem-se assexuadamente por divisão binária até à sua maturação em promastigotas metacíclicas (Sacks *et al.*, 1995). Estas formas não possuem capacidade de ligação às células epiteliais (Mahoney *et al.*, 1999) nem de divisão, mas apresentam elevada mobilidade e após acumulação migram para a zona proximal do tubo digestivo (válvula estemodal) onde são transmitidas a um novo hospedeiro durante nova refeição sanguínea (Fig. 5) (Bates, 2007).

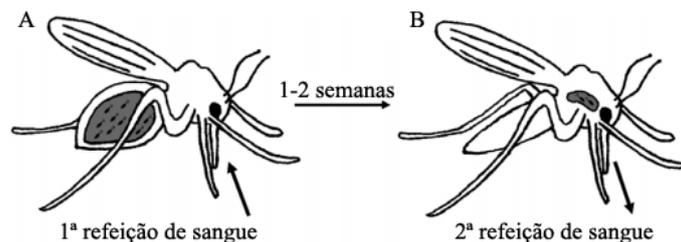


Figura 5 – Localização das promastigotas de *Leishmania* no inseto vetor.

(A) Intestino médio após a refeição sanguínea; (B) Válvula estemodal antes da inoculação num novo hospedeiro (Adaptado de Bates, 2007).

Existem dois ciclos epidemiológicos principais, o zoonótico e o antroponótico (Desjeux, 2001). O ciclo zoonótico inclui animais domésticos ou selvagens como reservatórios do parasita no ciclo de transmissão. No ciclo antroponótico o homem é a única fonte da infeção para o vetor.

Foi proposto um ciclo antroponótico de transmissão alternativo, artificial, com base na partilha de seringas por parte de utilizadores de drogas intravenosas, observado principalmente nos países do sul da Europa (Fig. 6). Este ciclo é considerado artificial pois a metaciclogénese não ocorre uma vez que a transmissão é feita através das formas amastigotas.

Muito raramente, a transmissão de *Leishmania*, tem sido descrita por outros meios alternativos, tais como transfusão de sangue, transmissão congênita e exposição ocupacional (adquirida em laboratórios) (Paredes *et al.*, 2003).

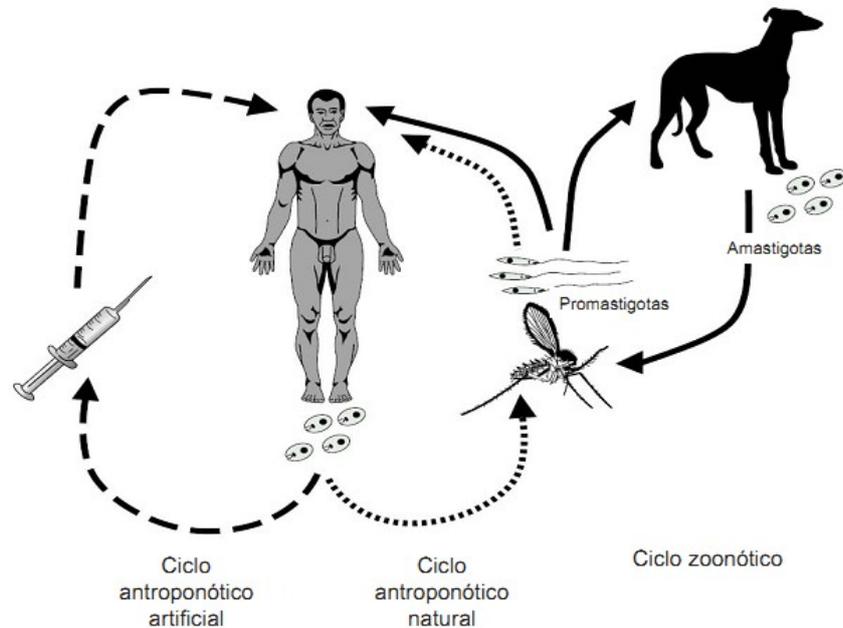


Figura 6 - Ciclos epidemiológicos de *Leishmania infantum* (adaptado de Vergara *et al.*, 2000).

Em infecções transmitidas por vetores, o agente infeccioso sobrevive num sistema constituído por um ou mais vetores e um ou mais hospedeiros mamíferos, ambos com grande densidade populacional e próximos espacialmente, permitindo a transferência contínua do agente entre vetores e hospedeiros. O hospedeiro mamífero responsável pela manutenção a longo-termo da população do agente infeccioso é designado por hospedeiro reservatório. Uma doença infecciosa que se transmite entre animais vertebrados, podendo o homem ser infetado acidentalmente, é designada por zoonose. A maioria das leishmanioses são zoonoses de animais selvagens e domésticos, sendo o homem um hospedeiro acidental, sem grande papel na manutenção das suprapopulações do parasita (Tabela I) (Ashford, 1996).

Um reservatório da leishmaniose é frequentemente uma espécie gregária, abundante e vive o tempo suficiente para que possa ser portador do agente infeccioso até à sua transmissão (Saliba & Oumeish, 1999). Também é importante que após a infeção pelo parasita, os hospedeiros continuem durante um longo período de tempo sem manifestar sintomas agudos da infeção, apresentando os parasitas na pele e na

circulação para que estes possam ser ingeridos pelos vetores. O homem normalmente não é considerado um bom reservatório para *Leishmania*, pois este parasita não tem uma longa duração de vida no sistema e nos casos em que persiste durante anos (ex. *L. infantum*) não se encontra na pele ou em circulação (Ashford, 1996).

Tabela I - Espécies de *Leishmania* e as respectivas manifestações clínicas no homem, reservatórios e distribuição geográfica (adaptado de Bates, 2007 e Ready, 2010)

Espécie de <i>Leishmania</i>	Leishmanioses	Principais Hospedeiros	Distribuição geográfica
<i>L. (L.) aethiopica</i>	Cutânea Local e Difusa	Hiracóides	Etiópia, Quênia
<i>L. (L.) major</i>	Cutânea	Roedores	Ásia Central, Norte Africano, Médio Oriente, África Oriental
Complexo <i>L. (L.) tropica</i>	Cutânea	Homem (Antroponótica)	Ásia Central, Médio Oriente, partes do Norte Africano, Sudoeste Asiático
<i>L. (L.) donovani</i>	Visceral	Homem (Antroponótica)	África, Ásia central, Sudeste Asiático
<i>L. (L.) infantum</i> (<i>L. (L.) chagasi</i>)	Cutânea e Visceral	Cães domésticos e selvagens	Europa, Norte Africano, América Central, América do Sul
Complexos <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	Cutânea	Primatas, roedores e marsupiais	Américas do Sul e Central
<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (V.) panamensis</i>	Mucocutânea	Roedores e marsupiais	Américas do Sul e Central
<i>L. (L.) mexicana</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutânea Difusa	Roedores e marsupiais	Américas (América Central, do Sul, México e EUA)

Devido à sua proximidade com o homem, o cão é um reservatório de diversas infecções zoonóticas e já foram encontrados cães infetados com as espécies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major* e *L. braziliensis*. No entanto, a infecção mais comum ocorre por *L. infantum* e algumas das outras infecções são apenas infecções acidentais, não constituindo o cão um hospedeiro reservatório importante. A infecção por *L. infantum* pode em alguns animais mais sensíveis provocar morte em poucos meses, mas a maioria mantém a infecção durante anos, inicialmente com os parasitas em pequenas lesões no local da picada. Posteriormente, estes infetam as vísceras e eventualmente tornam-se largamente

distribuídos na derme, favorecendo a transmissão pela picada do inseto vetor (Ashford, 1996; Saliba & Oumeish, 1999).

O cão, entre outras espécies de canídeos, é o principal reservatório doméstico e peridoméstico de *Leishmania infantum* em países do Sul da Europa e Norte Africano e de *Leishmania chagasi* na América Central e América do Sul. O número de transportadores assintomáticos varia de 25% até mais de 80%, dependendo da área geográfica e da técnica de detecção usada (Michel *et al.*, 2011).

Na Europa existem dois ciclos de transmissão com longo endemismo comprovados: a leishmaniose humana visceral e cutânea (zoonóticas) causada por *L. infantum* e a leishmaniose humana cutânea (antroponótica) causada por *L. tropica* (Fig. 7).

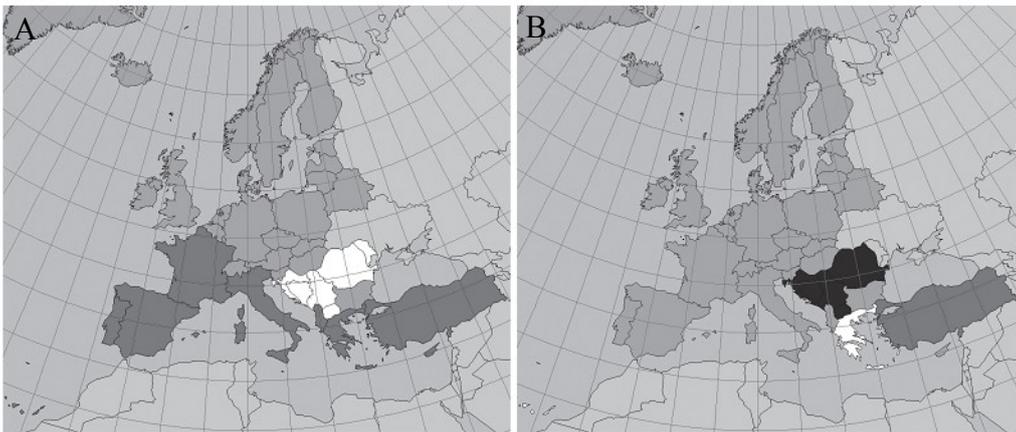


Figura 7 – Distribuição das espécies *L. infantum* (A) e *L. tropica* (B) nos países europeus até ao ano 2009. (■) espécie ausente; (■) espécie presente; (□) espécie esporádica; (■) infeções não caracterizadas (Adaptado de Ready, 2010).

1.3 – Leishmanioses

1.3.1 – Fisiopatologia

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da complexa interação entre o parasita e o hospedeiro, virulência das espécies de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro (Chang & Mcgwire, 2002; Murray *et al.*, 2005). Os protozoários *Leishmania* têm como alvo as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos e órgãos ricos em macrófagos (fígado, baço, medula óssea, pele e nódulos linfáticos). O resultado é um espectro de doenças que vai desde lesões localizadas na pele até ao envolvimento de todo o sistema reticuloendotelial, dependendo das células do SMF afetadas. Assim, normalmente são consideradas três formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea.

1.3.1.1 – Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como ‘*kala azar*’ é a forma mais severa da doença, com invasão das células do SMF do baço, fígado, medula e gânglios linfáticos.

Esta forma clínica da doença é causada por apenas três das mais de 20 espécies de *Leishmania* conhecidas e pertencem ao complexo *Leishmania donovani*: *L. infantum*, na Europa e Bacia do Mediterrâneo incluindo o Norte de África; *L. donovani*, no Sul da Ásia e África Oriental; *L. chagasi*, na América Central e do Sul (Desjeux, 2004).

A LV é, por vezes, precedida por uma lesão seca ou ulcerada no local da picada. Os sintomas consistem em febre irregular, anemia, aumento do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia) e perda de peso progressiva. Outros sinais clínicos menos frequentes incluem linfadenopatia e diarreia persistente. O período de incubação é bastante variável, podendo ser de semanas ou anos.

Na ausência de tratamento, a taxa de morte encontra-se próxima dos 100%, devido principalmente a infeções secundárias resultantes do estado imunológico debilitado (consequência do comprometimento dos macrófagos) e da desnutrição do paciente. No entanto, existem muitas pessoas que no decurso da sua vida são infetadas com uma das espécies que provoca LV mas nunca desenvolvem a doença e recuperam

espontaneamente. Nas infeções por *L. infantum* observaram-se recuperações de aproximadamente 100% em adultos saudáveis, enquanto em epidemias de *L. donovani* em África observaram-se valores inferiores a 25% (Ashford, 2000).

Após o tratamento e recuperação da LV, os doentes podem desenvolver leishmaniose cutânea crónica, conhecida como leishmaniose dermal pós-*Kala azar* ('*post Kala azar dermal leishmaniasis*' PKDL), caracterizada por uma erupção cutânea que se inicia na zona da boca espalhando-se para o resto do corpo. Esta complicação encontra-se geralmente associada à infeção por *L. donovani* no subcontinente Indiano e África Oriental, existindo casos associados às espécies *L. infantum* na bacia mediterrânea e *L. chagasi* na América do Sul. O tratamento necessário é longo e caro (Zijlstra *et al.*, 2003; Desjeux, 2004).

Nos últimos anos, o padrão de infeção por *L. infantum* tem vindo a alterar-se, desenvolvendo-se como doença oportunista em indivíduos adultos infetados com o vírus da imunodeficiência humana. Como ambos agentes infecciosos invadem os macrófagos, existe um efeito cumulativo na debilitação do sistema imunitário. Num indivíduo infetado com VIH, a *Leishmania* acelera a replicação do vírus devido a uma molécula principal da superfície da amastigota, o lipofosfoglicano, que induz a transcrição do VIH em células CD4 (Herwaldt, 1999; Cruz *et al.*, 2006). Esta coinfeção tem sido particularmente emergente nos países da bacia mediterrânica como Portugal, Espanha, Itália e França (Desjeux & Alvar, 2003). Nos casos europeus, LV é a terceira doença oportunista parasitária mais frequente, encontrando-se depois da toxoplasmose e da criptosporidiose.

1.3.1.2 – Leishmaniose cutânea

Na leishmaniose cutânea (LC), as células do SMF afetadas são as presentes na pele ocorrendo um largo número de úlceras nas zonas expostas do corpo como face, braços e pernas. Apresenta duas formas clínicas principais, nomeadamente a leishmaniose cutânea local (LCL) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD).

LCL aparece inicialmente como uma picada persistente de inseto e gradualmente a lesão alarga, permanecendo vermelha mas sem calor perceptível ou dor. Posteriormente, ocorre migração dos leucócitos que isolam a área afetada levando à necrose dos tecidos infetados e à formação de um granuloma cicatrizante na base da lesão. O processo de necrose pode ser rápido, causando uma ferida larga, aberta e

húmida (especialmente com *L. major*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*), ou pode ser mais demorado, sem verdadeira ulceração (com *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. peruviana*). A LC não se encontra geralmente associada a sinais ou sintomas sistêmicos, mas os gânglios linfáticos de drenagem podem aumentar e as lesões podem espalhar-se através dos dutos linfáticos aquando da infeção por *L. guyanensis* (Ashford, 2000).

O tempo de incubação varia entre uma a duas semanas até vários meses ou anos. Frequentemente ocorre cura espontânea sem recorrer ao tratamento, mas o tempo varia dependendo da espécie infetante e do local da lesão. Da mesma forma, o tamanho da lesão pode variar entre uns poucos milímetros até alguns centímetros de diâmetro. Esta forma de leishmaniose pode ser incapacitante em casos de múltiplas lesões e deixar cicatrizes permanentes. Após a recuperação, LC induz imunidade à reinfeção pelas espécies de *Leishmania* que causaram a doença (Desjeux, 2004).

Apesar de não muito comum, a leishmaniose cutânea também se pode desenvolver após infeção por *L. infantum*, tendo sido associada a casos LC desde 1980 em Espanha, França, Itália, Grécia, Norte de África (Belhadj *et al.*, 2003) e também em Portugal (Campino *et al.*, 2005). Nos focos de leishmaniose visceral humana, *L. infantum* MON-1 também pode ser responsável pela leishmaniose cutânea, apresentando assim tropismo para os tecidos cutâneos e órgãos profundos, dependendo do poder patogénico da estirpe parasitária e/ou da genética e estágio imunitário do hospedeiro.

A LCD é uma forma rara, as lesões são disseminadas e lembram lesões leprosas. Não existe ulceração da lesão inicial, ocorrendo disseminação para outros locais da pele através da corrente sanguínea. A doença é causada por *L. amazonensis* e *L. aethiopica*, encontrando-se restrita na Venezuela e Republica Dominicana (Novo Mundo) e à Etiópia e Quênia (Velho Mundo). Na LCD não ocorre cura espontânea e, devido à disseminação das lesões por todo o corpo, o tratamento é difícil. É uma forma associada a um sistema imunitário deficiente e frequentemente ocorrem recaídas após o tratamento (Grevelink & Lerner, 1996; Reithinger *et al.*, 2007).

1.3.1.3 – Leishmaniose mucocutânea

Na leishmaniose mucocutânea (LMC), também conhecida como ‘espundia’, ocorrem lesões desfigurantes na face, com destruição das membranas mucosas do nariz, boca e cavidades da garganta. Geralmente, encontra-se mais associada às espécies do

Novo Mundo, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. No entanto, foram encontrados casos no Velho Mundo causados pelas espécies *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* (em casos de pacientes imunodeprimidos) (Desjeux, 2004).

Os sintomas clínicos de LMC iniciam-se no local da picada do flebótomo, onde uma lesão semelhante à de leishmaniose cutânea se forma, ocorrendo cura espontânea. No entanto, ocorre a metastização secundária pelo organismo, por vezes após alguns anos, e as áreas das mucosas são atingidas. A mucosa e a cartilagem associada são gradualmente degradadas até que parte da face se encontra destruída tornando a cirurgia reconstrutiva uma parte importante da terapia. Devido à destruição do tecido, ocorre um aumento da vulnerabilidade, podendo levar à morte devido a infecções secundárias como pneumonia (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000; Neuber, 2008).

1.3.2 – Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o parasita é endêmico em 98 países, apresentando uma prevalência mundial de aproximadamente 12 milhões de casos e mortalidade anual de cerca 60000 devido a leishmaniose visceral, tornando esta doença na segunda maior causa de morte devido a doenças por protozoários. O impacto desta doença na saúde pública é ainda subestimado, existindo muito casos que não são notificados. De facto, o número de casos reportados é bastante inferior já que em apenas um terço dos países em desenvolvimento, com leishmaniose endêmica, 85 dos 98, ocorre notificação obrigatória da doença. Grande parte da população afetada nestas zonas não têm acesso a programas de saúde, tornando o diagnóstico e tratamento indisponíveis devido ao tempo e custo da viagem até centros médicos ou ignorância sobre a disponibilidade desses serviços (WHO, 2010).

Estima-se que 350 milhões de pessoas em todo o mundo se encontrem em risco, com uma incidência anual de cerca 2 milhões de novos casos, sendo aproximadamente 1,5 milhões de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral.

Mundialmente a leishmaniose distribui-se por zonas intertropicais, nomeadamente África, Centro e Sul Americano, Centro e Sul Asiático, Bacia Mediterrânica e Médio Oriente (Tabela I; Fig. 8 e 9).

Dados recentes apontam para um aumento nos últimos anos de casos de leishmaniose, que pode ser explicado por um melhor diagnóstico e notificação (Reithinger *et al.*, 2007), um aumento nos fatores de risco, tais como alterações

ambientais, migração, deflorestação, urbanização, alterações na suscetibilidade do hospedeiro (imunossupressão e malnutrição) e aquisição de resistência ao tratamento (Desjeux, 2001).

Alterações nos fatores de risco podem levar ao aparecimento de epidemias, como a de leishmaniose visceral no Sudão no início dos anos 90, onde morreram 100 mil pessoas, correspondente a 10% da população (Desjeux, 2004; Kolaczinski, 2008).



Figura 8 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral: 90% dos casos de LV ocorre em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Adaptado de WHO, 2010).



Figura 9 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea: 90% dos casos ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Perú, Arábia Saudita e Síria (Adaptado de WHO, 2010).

Um dos fatores para o aumento do número de infetados é o aparecimento da leishmaniose como uma das doenças oportunistas em indivíduos infetados com VIH, envolvendo a maioria das coinfeções a forma visceral da doença.

Apesar da distribuição geográfica da leishmaniose estar restrita às áreas de distribuição dos flebótomos, *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, a infeção VIH modifica os tradicionais padrões zoonóticos/antroponóticos da transmissão de *Leishmania*. O fraco resultado terapêutico, a maior taxa de recaídas, o poliparasitismo da leishmaniose visceral em pessoas infetadas com VIH, bem como as manifestações atípicas da doença que conferem um diagnóstico difícil, tornam os indivíduos infetados com VIH responsáveis pelo aumento do número de reservatórios humanos em áreas onde a transmissão da leishmaniose é antroponótica. Além disso, as mesmas características ajudam a criar novos focos de transmissão antroponótica em áreas onde a propagação da leishmaniose era tradicionalmente zoonótica (Molina *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2005).

A coinfeção alterou os padrões epidemiológicos da LV na Europa. A doença que afetava principalmente as crianças (70% dos doentes com idade inferior a 15 anos), passou a atingir mais os adultos (73,3% dos casos reportados na Europa têm idades entre 31-50 anos) (Desjeux & Alvar, 2003; Cruz *et al.*, 2006).

A rede de vigilância da coinfeção *Leishmania*/VIH foi constituída em 1994. No entanto, a maioria dos países do sudoeste Europeu ainda não se encontram cobertos por esta rede. Este facto torna os dados da coinfeção incompletos e subestimados (Fig. 10) (Desjeux & Alvar, 2003).

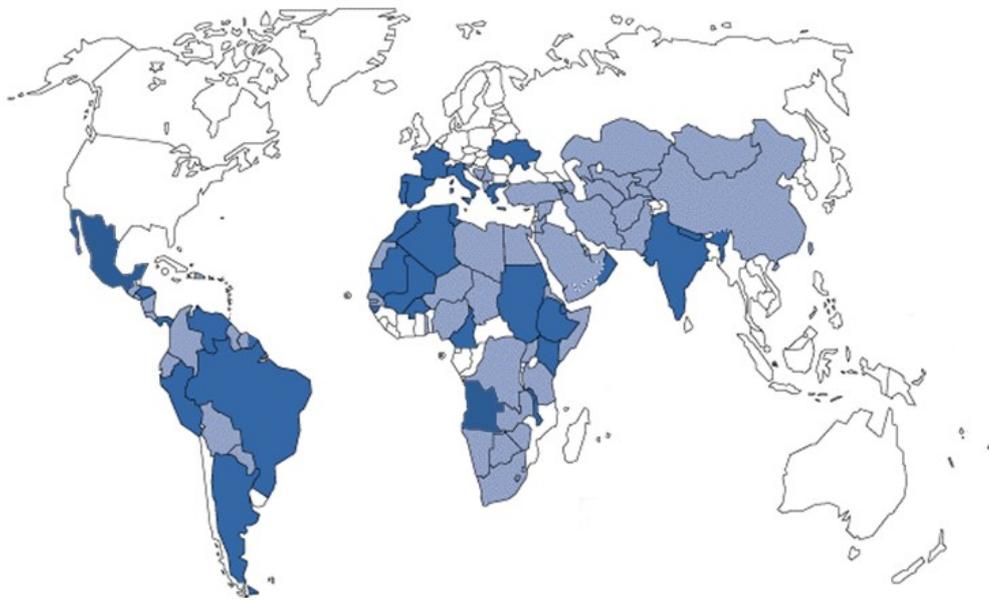


Figura 10 – Distribuição mundial da leishmaniose (■) e de países que identificaram coinfeção *Leishmania*/VIH (■) até 2001 (Adaptado de Desjeux & Alvar, 2003).

Em Portugal, constituem áreas endémicas de leishmaniose o Algarve, a península de Setúbal, a área metropolitana de Lisboa, a bacia hidrográfica do Baixo Mondego e o município rural de Alijó (Alto Douro) (Campino *et al.*, 2006). Apesar da distribuição geográfica da leishmaniose estar restrita às áreas de distribuição dos vetores, a infeção por VIH modifica o tradicional padrão de transmissão zoonótico/antroponótico. Desde o início de 2000 até ao final de 2009 foram diagnosticados laboratorialmente na Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 173 novos casos de LV humana, 66 dos quais em indivíduos imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e 107 em adultos imunodeprimidos (Campino & Maia, 2010).

O número de casos de leishmaniose canina (LCan) também tem vindo a aumentar no nosso País, sendo uma zoonose de notificação obrigatória desde 2002. Ainda que existam regiões endémicas bem identificadas, observam-se por todo o país casos de LCan, podendo nas regiões mais endémicas chegar aos 40% de animais infetados (Campino & Maia, 2010).

1.3.3 – Tratamento

A leishmaniose é uma doença com uma vasta distribuição geográfica, principalmente em países em desenvolvimento. O tratamento para esta doença não é sempre necessário e depende da manifestação clínica. No caso de leishmaniose cutânea, geralmente as lesões curam-se naturalmente em poucos meses e cria-se forte imunidade. No entanto, podem ocorrer complicações, as lesões demorarem mais tempo a curar, formarem-se lesões múltiplas ou desfigurantes, justificando-se o tratamento. A leishmaniose cutânea difusa, apesar de não ameaçar a vida, é muito desfigurante devendo também ser tratada. Doentes com leishmaniose visceral sintomática ou mucocutânea avançada têm de receber tratamento ou apresentam um elevado risco de morte (perto dos 100% na leishmaniose visceral). No entanto, mesmo nos indivíduos com o tratamento instituído pode ocorrer morte devido a complicações da doença, resistência ao tratamento, toxicidade dos medicamentos ou deteção tardia da doença (Ahasan *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2007).

Os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (pentostam) e meglumina antimoniato (glucantime), foram os primeiros fármacos a serem introduzidos na terapêutica da leishmaniose e são utilizados como primeira linha de tratamento em várias regiões do mundo. Os antimoniais pentavalentes estão associados a severos efeitos secundários e são administrados num longo período de tempo, 20 ou mais dias, por injeção intravenosa (para leishmaniose visceral ou cutânea severa) ou por injeção intramuscular na periferia das lesões isoladas (Ashford, 2000). Atualmente, existem muitos casos de resistência ao tratamento (Croft *et al.*, 2006; Aït-Oudhia *et al.*, 2011).

A segunda linha de tratamento, para quando os antimónios são ineficazes ou contraindicados, consiste na anfotericina B e principalmente a sua forma lipossômica, pentamidina, paramomicina, alopurinol, miltefosina, entre outros em diversas combinações ou formulações (Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Croft *et al.*, 2005). A miltefosina (hexadecilfosfocolina: HePC), uma alquilfosfocolina, inicialmente desenvolvida como droga anticancerígena, foi o último fármaco anti-*Leishmania* a entrar no mercado (registado na Índia em 2002) e o primeiro medicamento oral eficaz para o tratamento da leishmaniose visceral, constituindo um avanço terapêutico muito importante (Croft & Coombs, 2003). Apesar de promissor, o preço impossibilita muitas pessoas de ter acesso ao tratamento já que 90% das pessoas infetadas na Índia vivem na

pobreza (Sundar & Murray, 2005) e também não pode ser administrado a mulheres em idade fértil tendo efeitos nocivos na reprodução (Guerin *et al.*, 2002; Moore & Lockwood, 2010). Mesmo tendo sido introduzida recentemente, já existem casos de resistência ao tratamento com miltefosina, provavelmente devido à longa semivida do composto (cerca de 152 horas) (Cojean *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012).

Assim, todos os fármacos disponíveis apresentam várias limitações (Tabela II).

Tabela II – Fármacos usados na terapêutica da leishmaniose visceral.
(adaptado de Moore & Lockwood, 2010).

Terapia disponível	Vantagens	Desvantagens	Locais de utilização
Estibogluconato de Sódio (SSG)	<ul style="list-style-type: none"> • Longo histórico de utilização eficiente; • Barato. 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade (vômitos, cardíaca, hepática); • Falha no tratamento clínico na Índia; • Longo tratamento; • Ausência de preparações orais. 	África Oriental
Anfotericina B	<ul style="list-style-type: none"> • Boa eficácia, especialmente após falha de tratamento com SSG. 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade (reações à infusão, renal); • Longo tratamento; • Ausência de preparações orais. 	Índia
Anfotericina B lipossomal	<ul style="list-style-type: none"> • Eficácia excelente, mesmo em pacientes com VIH; • Tratamento curto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Caro; • Ausência de preparações orais. 	Países ricos
Miltefosina	<ul style="list-style-type: none"> • Preparação Oral; • Boa eficácia em pacientes com VIH. 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicidade reprodutiva; • Toxicidade (gastrointestinal); • Pouca eficácia (mas menor mortalidade) em paciente com VIH em comparação com SSG. 	Índia
Paromomicina	<ul style="list-style-type: none"> • Barato; • Taxas de cura semelhantes às de anfotericina B na Índia; • Largo espectro de atividade, útil nas doenças diarreicas, intercorrentes em África. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fornecimento do fármaco variável; • Toxicidade (ototoxicidade, hepatotoxicidade); • Ausência de preparações orais. 	Índia; África (em combinação com SSG).
Pentamidina	<ul style="list-style-type: none"> • Útil na prevenção secundária em pacientes com VIH. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouca eficácia como tratamento primário; • Toxicidade (cardíaca, diabetes, gastrointestinal). 	América do Sul; Europa (profilaxia em portadores de VIH).

A monoterapia é uma das causas do desenvolvimento de resistência ao tratamento (Kappagoda *et al.*, 2011). Assim, uma abordagem interessante para diminuir este acontecimento e também a duração e custo dos tratamentos, é a terapêutica combinada. Este método é importante para proteger o tempo de vida de novos e velhos medicamentos (Guerin *et al.*, 2002; Gazanion *et al.*, 2011). A combinação de fármacos já demonstrou ser um recurso essencial no tratamento de infecções microbianas verificando-se um aumento de eficácia pela utilização de compostos com atividade sinérgica ou aditiva, uma prevenção do desenvolvimento de resistência à droga, a utilização de doses menores, a redução do aparecimento de efeitos tóxicos e de custos (Croft *et al.*, 2006).

De facto, a terapêutica combinada de meglumina antimoniato e imiquimode para a leishmaniose cutânea (Meymandi *et al.*, 2011) e de diversas combinações entre anfotericina B, anfotericina B lipossomal, miltefosina e paramomicina para a leishmaniose visceral (Sundar *et al.*, 2011) foram testadas com resultados positivos, observando-se menos efeitos secundários e uma diminuição na duração da terapia.

1.3.3.1 – Novas abordagens para a terapêutica da leishmaniose

A investigação com o objetivo de identificar e validar novos alvos terapêuticos é importante no processo de descoberta de novos fármacos. Como a biologia celular de *Leishmania* difere consideravelmente das células de mamíferos, distinção que se estende ao nível bioquímico, também muitas das proteínas do parasita são suficientemente diferentes das células do hospedeiro para que possam ser exploradas como alvos terapêuticos (Croft & Coombs, 2003). Vários estudos identificaram vias metabólicas e proteínas específicas em *Leishmania* que podem servir como alvos terapêuticos, tais como topoisomerasas de ADN, cinases dependentes de ciclinas (cdk), cinases de proteínas ativadas por agentes mitogénicos (MAPKs), metacaspases, argininosuccinato sintetase, peptidases, calreticulina, proteína dissulfeto isomerase, entre outros alvos (Duncan *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012).

Os compostos naturais têm sido extensivamente usados no tratamento de muitas doenças e são do interesse para os investigadores tanto nas suas formas naturais, como modelos para a modificação sintética. Muitos destes compostos já demonstraram efeitos anti-*Leishmania*, tais como os extratos de plantas (González-Coloma *et al.*, 2012), óleos

essenciais (Monzote *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010) e triterpenos (Takahashi *et al.*, 2004; Torres-Santos *et al.*, 2004; Filho *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2010).

A betulina (lup-20(29)-ene-3,28-diol) é um triterpeno pentacíclico com um núcleo lupano, caracterizado pela presença do grupo isopropilideno (Fig. 10). É isolada principalmente a partir da casca de bétula, cujas propriedades medicinais (da casca e dos seus extratos) são bem conhecidas na medicina tradicional. A betulina possui três posições na sua estrutura onde modificações químicas podem facilmente ser efetuadas, podendo originar um grande número de derivados, com potenciais atividades diferentes. O ácido betulínico é farmacologicamente mais ativo e pode ser convertido a partir da betulina em dois passos com 75% de rendimento global (Alakurtti *et al.*, 2006).

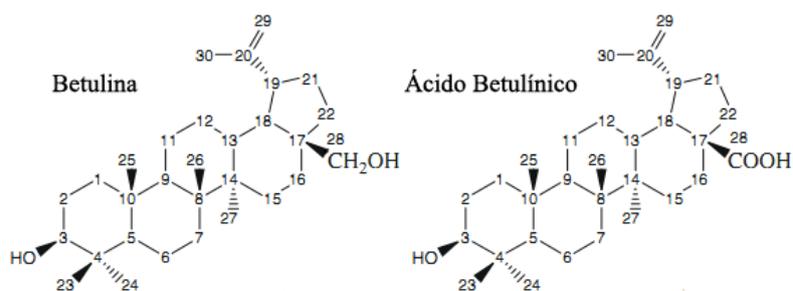


Figura 11 – Estrutura química da Betulina e do Ácido Betulínico (adaptado de Santos *et al.*, 2009).

Os triterpenos betulina e, especialmente, o seu derivado ácido betulínico têm demonstrado atividades anticancerígenas, anti-VIH, anti-inflamatórias e antimaláricas (Baglin *et al.*, 2003; Cicherwicz & Kouzi, 2004; Alakurtti *et al.*, 2006). Estudos recentes mostraram também atividade anti-*Leishmania* de derivados da betulina e do ácido betulínico (Alakurtti *et al.*, 2010; Domínguez-Carmona *et al.*, 2010).

O sucesso prévio na atividade anti-*Leishmania* de compostos formulados inicialmente como anticancerígenos (ex: miltefosina; edelfosina) tem demonstrado a importância de testar este tipo de compostos na indução de morte de *Leishmania* sp. (Duncan *et al.*, 2011).

Os fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são limitados, com sérios efeitos secundários e elevada toxicidade. Adicionalmente, ocorre desenvolvimento de resistência (Croft *et al.*, 2006) e o tratamento é de longa duração com elevados custos (WHO, 2010). Como a prevalência das doenças parasitárias ocorre nas áreas mais pobres no mundo, o mercado não tem a força económica suficiente para implementar a descoberta e desenvolvimento de novas drogas (Pink *et al.*, 2005).

Assim, é urgente a procura e o desenvolvimento de novas moléculas com actividade anti-*Leishmania* de forma a promover potenciais tratamentos para a leishmaniose.

Capítulo 2
Objetivos

2 – Objetivos

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

Assim, foi desenvolvido um plano de trabalho com os seguintes objetivos:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de 16 derivados da betulina e do ácido betulínico em promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Avaliar a actividade anti-*Leishmania* de combinações dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos com a miltefosina, um dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose, de forma a determinar a natureza das associações (sinergismo, aditividade ou antagonismo);
- Caracterizar a atividade anti-*Leishmania* quanto aos mecanismos envolvidos, avaliando os seus efeitos sobre o ciclo celular, a apoptose/necrose e a morfologia das promastigotas de *L. infantum*;
- Sinalizar a potencial citotoxicidade sobre os macrófagos de mamíferos, alvo de infecção por parte do parasita, dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos.

Capítulo 3

Material e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 – Compostos

A miltefosina foi obtida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Os dezasseis derivados da betulina e do ácido betulínico (Tabela III) utilizados no presente trabalho foram sintetizados pelo grupo liderado pelo Professor Jorge Salvador do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Estes derivados foram inicialmente preparados como parte integrante de uma larga biblioteca de compostos para avaliação antitumoral.

As soluções *stock* (10 mM) dos derivados da betulina e do ácido betulínico foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C. A solução *stock* de miltefosina (10 mM) foi preparada em água desionizada e armazenada a 4°C.

Tabela III –Nomenclatura dos derivados da betulina e do ácido betulínico aprovada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Derivado	Designação IUPAC
BT01	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-ilo
BT02	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 28-hidroxi-lup-20(29)-en-3β-ilo
BT03	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de lup-20(29)-en-3β,28-di-ilo
BT04	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 30-metoxi-lup-20(29)-en-3β,28-di-ilo
BT05	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-30-metoxi-lup-20(29)-en-28-ilo
BT06	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-(20 <i>R</i>)-lupan-29-oxo-28-ilo
BT07	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de (20 <i>R</i>)-lupan-29-oxo-3β,28-di-ilo
BT08	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- carboxilato de 3β-acetoxi-lup-20(29)-en-28-ilo
BT09	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- carboxilato de 28-acetoxi-lup-20(29)-en-3β-ilo
AB10	28-(1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)-lup-20(29)-en-3,28-diona
AB11	Ácido 3β-(1 <i>H</i> -imidazol-1-carboxiloxi)-lup-20(29)-en-28-óico
AB12	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 28-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-28-oxo-lup-20(29)-en-3β-ilo
AB13	(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-carboxilato de 28-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-3,28-dioxo-lup-1,20(29)-dien-2-ilo
AB14	2-hidroxi-28-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-lup-1,20(29)-dien-3,28-diona
AB15	28-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)-lup-1,20(29)-dien-3,28-diona
AB16	3β-(1 <i>H</i> -imidazol-1-carboniloxi)-lup-20(29)-en-28-oate de metilo

3.2 – Origem e cultura de *Leishmania*

As formas promastigotas de *L. infantum* Nicolle (zimodemo MON-1) foram mantidas a 26°C, com passagens semanais, em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado com Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES) (25 mM) enriquecido com 10% soro bovino fetal (SBF) inativado.

3.3 – Estudos de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este teste baseia-se na capacidade das desidrogenases das células viáveis reduzirem o sal hidrossolúvel MTT, de cor amarela, num produto lipossolúvel, a formazana de cor azul que absorve a 530 nm. Assim, como só as células viáveis reduzem o MTT é possível quantificá-las por espectrofotometria a 530 nm. (Denizot, *et al.*, 1986; Twentyman & Luscomb, 1987).

Os derivados da betulina e do ácido betulínico foram diluídos, a partir das soluções *stock*, em meio de cultura de forma a obter uma gama de concentrações de ensaio de 1 a 100 µM. A concentração máxima de DMSO nos ensaios não excedeu 1%, concentração que não interferiu de forma significativa na viabilidade celular. Paralelamente, foram realizados ensaios controlo de suscetibilidade com a miltefosina (1 a 12 µM), um dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

As promastigotas de *L. infantum* (2×10^6 células.ml⁻¹) em fase logarítmica foram incubadas em placas de cultura de 96 poços a 26°C durante 24 horas, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25mM) enriquecido com 10% SBF inativado, na presença de concentrações crescentes dos compostos. Os ensaios controlo foram efetuados ao mesmo tempo e nas mesmas condições, na presença e ausência do solvente usado na dissolução dos derivados (DMSO).

Após o período de incubação, 25 µl de uma solução de MTT (5 mg.ml⁻¹) foi adicionada a cada poço e as células foram incubadas a 37°C durante 2 horas. Posteriormente efetuou-se uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e as promastigotas foram lavadas com tampão PBS. Após aspiração do sobrenadante, os cristais de formazana foram dissolvidos em 250 µl de DMSO e a absorvância foi lida a 530 nm em leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK). A viabilidade celular foi calculada

usando a fórmula $[(L2/L1) \times 100]$, onde L1 representa a absorvância das células controle e L2 a absorvância das células tratadas. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade relativamente ao controle e a concentração efetiva a inibir a viabilidade das promastigotas de *Leishmania* a 50% (CI₅₀) foi determinada através de regressões dose-resposta, extrapoladas pelo GraphPad Prism 5. Todas as experiências foram realizadas em triplicado e, pelo menos, em três ensaios independentes.

3.4 – Estudo da combinação entre os derivados da betulina e do ácido betulínico e a miltefosina

O estudo das combinações entre os derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos com a miltefosina foram efetuados com o objetivo de avaliar as interações entre os compostos. Assim, as promastigotas de *L. infantum* (2×10^6 células.ml⁻¹) em fase logarítmica foram incubadas em placas de cultura de 96 poços durante 24 horas a 26°C, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, na presença de concentrações crescentes dos derivados e de concentrações fixas de miltefosina. Também foram efetuados controlos na presença e ausência do solvente DMSO. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT, como descrito no ponto anterior. Os resultados foram expressos em percentagem de viabilidade relativamente ao controle e o CI₅₀ das combinações foi determinado através de regressões dose-resposta, extrapoladas pelo GraphPad Prism 5. Todas as experiências foram realizadas em triplicado e, pelo menos, em três ensaios independentes.

A natureza da interação entre os compostos foi avaliada através da análise isobolográfica, método geométrico que permite determinar os três tipos de associação mais importantes: adição, sinergismo e antagonismo (Berenbaurn, 1977; Zhao *et al.*, 2004). A análise isobolográfica avalia a natureza da interação de dois compostos, A e B. As concentrações de cada composto são representadas no gráfico, o composto A nas ordenadas e o composto B nas abcissas. Para cada composto é marcado o ponto em que, isolados, atingem o valor de CI₅₀ e a linha que une estes pontos é designada por linha isobolográfica. Cada ponto no gráfico (X, Y e Z) representa a concentração dos dois compostos que produz o efeito inibitório a 50% quando inoculados em associação. Se os valores determinados experimentalmente coincidirem com a linha (X), a associação é aditiva, não havendo interação. Se os pontos se encontrarem acima da linha (Z) a

interação é antagonista, e se situarem abaixo da linha (Y) o efeito da combinação é sinérgico (Fig. 12).

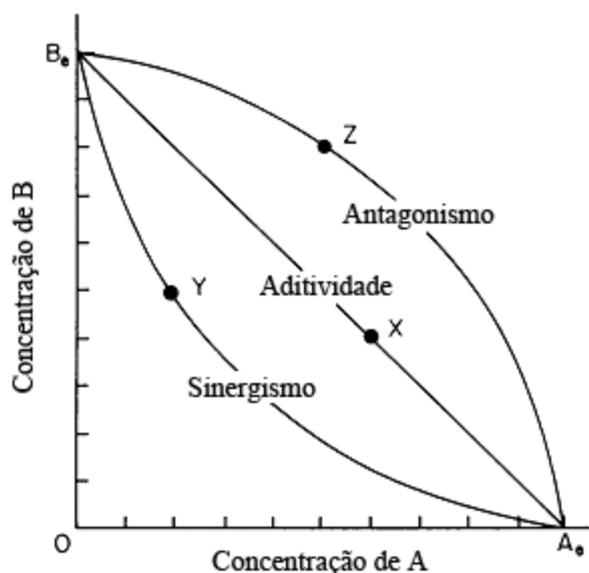


Figura 12 – Isoblograma da associação de dois compostos (A e B). (Z) antagonismo; (X) adição; (Y) sinérgico. (Adaptado de Berenbaum, 1977).

3.5 – Estudo morfológico por microscopia ótica

Os efeitos dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos, em concentrações CI_{50} , na morfologia das promastigotas de *L. infantum* foram estudados diretamente por microscopia de contraste de fase e por microscopia ótica de fase normal após coloração de Giemsa.

As promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células. ml^{-1}) foram incubadas a 26°C durante 2, 4, 6 e 24 horas, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, com soluções dos derivados nas respectivas concentrações CI_{50} . Os ensaios controle foram efetuados nas mesmas condições, na ausência dos compostos e na presença do veículo de dissolução (DMSO). Após cada período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi rejeitado por aspiração. O sedimento das células foi ressuspenso em meio fresco e cerca de 10 μl foi colocado numa lâmina de Koch e observado diretamente ao microscópio ótico de contraste de fases (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, 165 DN100 Nikon). Paralelamente, foi efetuado um esfregaço que foi submetido à coloração por Giemsa. Para tal, o esfregaço foi fixado

com metanol durante 5 minutos, corado com uma solução aquosa de Giemsa (1/10, V/V) durante 10 minutos à temperatura ambiente e por último lavado com água e seco ao ar. O esfregaço corado foi observado ao microscópio com objetiva de 100x (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, 165 DN100 Nikon).

3.6 – Estudo da integridade do ADN

Os efeitos dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos, em concentrações CI_{50} , na integridade do ADN das promastigotas de *L. infantum* foram avaliados recorrendo-se à eletroforese do referido material genético.

As promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células. ml^{-1}) foram incubadas a 26°C durante 24 horas, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, com os derivados nas respetivas concentrações CI_{50} . Os controlos foram efetuados nas mesmas condições mas na ausência dos compostos e na presença do solvente (DMSO). A extração de ADN foi realizada recorrendo ao *Kit DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante aspirado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 200 μ l PBS e foi adicionado 20 μ l de Proteinase K e 200 μ l do tampão AL. Após vórtex da mistura, seguiu-se incubação a 56°C por 10 minutos após a qual se adicionou 200 μ l de etanol (96-100%), seguindo-se novo vórtex. A mistura foi transferida para uma coluna de *spin DNeasy Mini*, previamente colocada num tubo coletor de 2 ml. Foi efetuada centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto e o tubo coletor foi rejeitado colocando-se a coluna num novo tubo. Após adição de 500 μ l do tampão AW1 seguiu-se nova centrifugação e a coluna foi colocada num novo tubo coletor. À coluna foi adicionado 500 μ l do tampão AW2 seguindo-se uma centrifugação a 14000 rpm durante 3 minutos para secar a membrana *DNeasy*. Por fim, a coluna foi colocada num tubo de 1,5 ml e 100 μ l do tampão AE foram adicionados à membrana, seguindo-se incubação durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto para eluir o ADN. Este passo foi repetido para um máximo rendimento de ADN.

Após a purificação do ADN, 16 μ l foram misturados com 4 μ l de uma solução aquosa de azul de bromofenol e aplicados nos poços do gel de agarose (*Bioplastics RESult™ LE*) a 1% (TBE, p/v) com brometo de etídio ($0,5 \mu g.ml^{-1}$) (*plus one, Pharmacia Biotech*). A migração eletroforética decorreu a 80 V durante 90 minutos em

tampão de corrida TBE 1x. O gel foi visualizado e fotografado (*Uvitec-Uvisave*, Alfagene) sobre luz ultravioleta, num transiluminador adequado (*Vilbert Lourmat*).

3.7 – Citometria de fluxo

3.7.1 – Estudo do ciclo celular

Os efeitos dos derivados mais ativos no ciclo celular das promastigotas de *L. infantum* foram avaliados através da determinação do conteúdo de ácido desoxirribonucleico por citometria de fluxo, após marcação das células por iodeto de propídio (IP) (Barlogie, *et al.*, 1983; Mancini, *et al.*, 1997). Este composto intercala a estrutura de ADN e quando excitado com luz de comprimento de onda de 480 nm, fluoresce com um máximo de emissão a 623 nm, sendo a intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de ADN ligado (Krishan, 1975).

Os resultados são representados sob a forma de histograma de ADN, em que é dado o número relativo de células em cada fase do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M. Assim, o pico de G0/G1 representa as células com menor quantidade de ADN e o de G2/M as células com maior quantidade, ou seja, com o dobro da fluorescência em relação ao primeiro grupo. Por fim, um terceiro grupo com quantidade intermédia de ADN corresponde às células em fase de síntese (S) (Ormerod, 2002).

As promastigotas de *L. infantum* (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubadas a 26°C durante 2, 4, 6 e 24 horas em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, na presença e na ausência (controles) dos derivados nas respetivas concentrações CI₅₀.

Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e o sedimento foi fixado com 200 µl de etanol a 70% durante 30 minutos a 4°C. Após fixação com etanol e lavagem com PBS (suplementado com 2% de BSA), as células foram incubadas com 500 µl de solução de IP (PI/RNase, Immunostep) durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguida de análise no citómetro de fluxo (FacsCalibur). Os resultados foram analisados no programa ModFit LT V 2.0.

3.7.2 – Estudo da apoptose e necrose

A morte celular pode ocorrer por apoptose, autofagia ou necrose (Smith & Yellon, 2011). Um método para diferenciar células viáveis de células apoptóticas ou necróticas é a comarcação com iodeto de propídio (IP) e anexina-V.

Nos estágios iniciais da morte celular por apoptose ocorrem diversas alterações na superfície celular, nomeadamente a exposição da fosfatidilserina (PS), fosfolípido carregado negativamente e predominante, em condições normais, na superfície interna da membrana celular. A anexina-V é uma proteína que liga preferencialmente este fosfolípido e é incapaz de atravessar a membrana plasmática intacta, ligando-se assim à fosfatidilserina apenas quando esta se encontra na camada exterior da membrana plasmática em células apoptóticas ou quando existe perda de integridade da membrana em células necróticas (Vermes *et al.*, 1995).

A anexina-V ligada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou a outros fluorocromos, permite a utilização da citometria de fluxo na deteção da ligação à fosfatidilserina. No entanto, a marcação isolada por anexina-V/FITC não permite distinguir entre a célula em apoptose e a célula em necrose. Como o IP não atravessa a membrana, liga-se apenas aos ácidos nucleicos das células necróticas. Assim, a conjugação das marcações permite diferenciar células viáveis (FITC⁻/IP⁻), apoptóticas (FITC⁺/IP⁻) e necróticas (FITC⁺/IP⁺) através da citometria de fluxo (Vermes *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 2000).

As promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubadas a 26°C durante 2, 4, 6 e 24 horas, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) enriquecido com 10% SBF inativado, com os derivados da betulina e do ácido betulínico nas respetivas concentrações CI₅₀. Os ensaios controlo foram efetuados nas mesmas condições com percentagens correspondentes de DMSO.

Para cada tempo de ensaio, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas por centrifugação com PBS, ressuspensas em 100 µl de tampão de ligação e incubadas com 5 µl de anexina-V/FITC e 5 µl de IP (AnnexinV-FITC Apoptosis detection Kit, Immunostep) durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, foram adicionados 400 µl de tampão de ligação e foi efetuada a análise por citometria de fluxo (FacsCalibur). A leitura dos resultados foi efetuada com a utilização do programa *Paint-a-gate Pro* 3.0.2, sendo os valores

expressos em percentagem de células positivas para determinada marcação, relativamente ao número total de células analisadas.

3.8 – Citotoxicidade de células de mamífero

Os ensaios de citotoxicidade dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos foram realizados em células de mamífero, utilizando a linha celular de macrófagos (RAW 264.7). As células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços em meio de Earle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) e incubadas a 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂. Assim que as monocamadas celulares atingiram confluência, o meio foi removido e as células foram incubadas com meio fresco na ausência (controles) e na presença dos derivados nas concentrações CI₅₀, durante 24 horas a 37°C e em atmosfera com 5% CO₂. Após o período de incubação, as monocamadas foram lavadas com tampão PBS (pH 7,2) e a cada poço foi adicionado 450 µl de PBS e 50 µl de uma solução de MTT (5 mg.ml⁻¹). Após incubação de 1 hora a 37°C, o sobrenadante foi removido, as células lavadas em PBS e 500 µl de DMSO foi adicionado de forma a dissolver a formazana. A absorvância a 530 nm foi determinada num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK) e a viabilidade celular foi calculada pela relação entre a absorvância no controlo e no ensaio usando a seguinte fórmula: $[(L2/L1) \times 100]$, onde L1 representa a absorvância das células controlo e L2 a absorvância das células tratadas. As experiências foram realizadas em triplicado e pelo menos em três ensaios independentes.

3.9 – Análise estatística

Todas as experiências foram efetuadas em triplicado. A média e o desvio padrão (SEM) de três ensaios independentes foram determinados e a análise estatística entre os valores das médias foi efetuada por testes student t e ANOVA com Dunnett's post-test. O nível de significância representado *p < 0,05; **p < 0,01 e ***p<0,001.

Capítulo 4
Resultados

4 – Resultados

4.1 – Atividade anti-*Leishmania* dos derivados da betulina e do ácido betulínico

A suscetibilidade das promastigotas de *L. infantum* aos derivados da betulina (BT01 a BT09) e do ácido betulínico (AB10 a AB16) foi avaliada pela viabilidade celular recorrendo ao teste do MTT (Denizot *et al.*, 1986). As promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células por ml^{-1}) foram incubadas em placas de cultura de 96 poços com concentrações crescentes dos derivados em meio de crescimento RPMI 1640 durante 24 horas a 26°C . Posteriormente, as promastigotas foram incubadas com MTT e após duas horas determinou-se a absorvância a 530 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis relativamente ao controlo.

A redução da viabilidade celular foi verificada na presença de todos os derivados da betulina (Fig. 13) e do ácido betulínico (Fig. 14), exceto com o derivado AB12. O efeito foi dependente da concentração e os derivados mais ativos foram o BT06 (Fig. 13B) e o AB13 (Fig. 14).

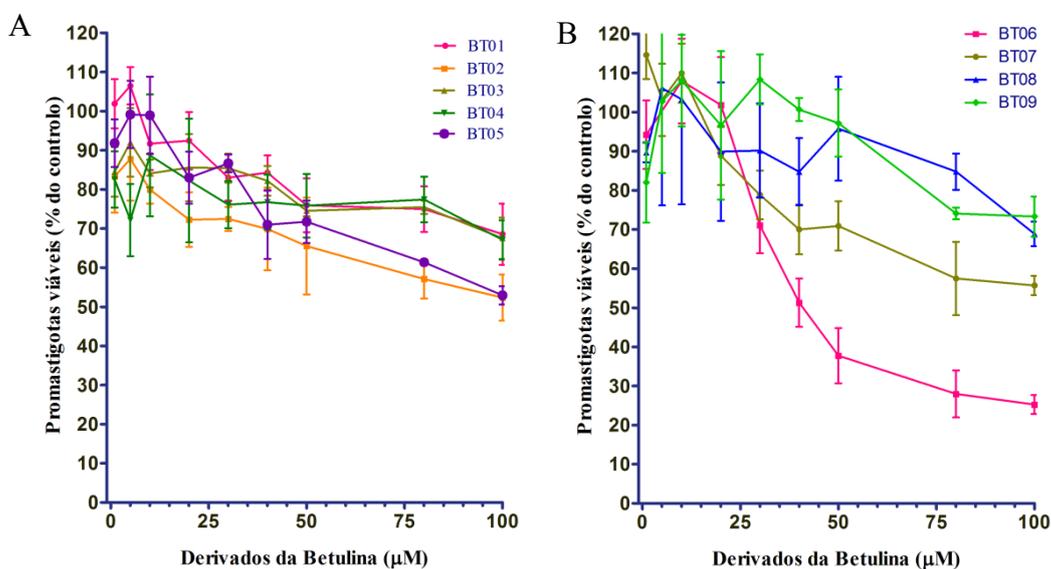


Figura 13 – Efeito dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*. As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células. ml^{-1}) foram incubadas por 24h na presença de concentrações crescentes dos derivados da betulina. (A) BT01-BT05; (B) BT06-BT09. Os valores médios e os erros padrão da média foram calculados a partir de três experiências independentes.

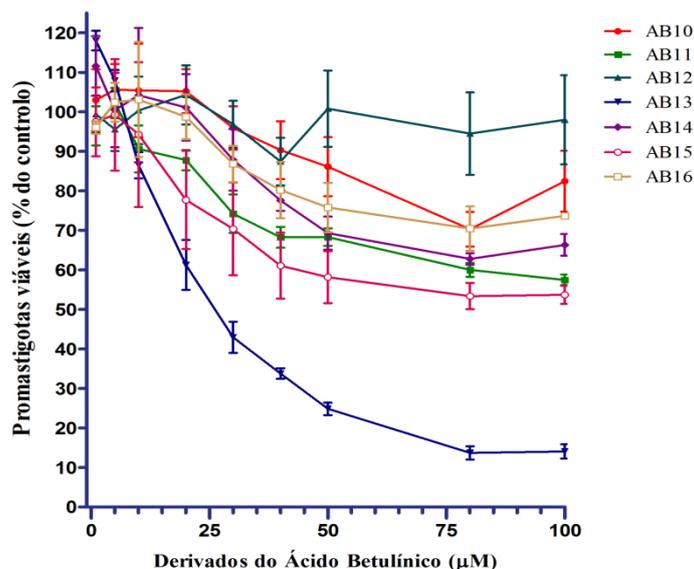


Figura 14 – Efeito dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*. As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.mL⁻¹) foram incubadas por 24h na presença de concentrações crescentes dos derivados do ácido betulínico, AB10-AB16. Os valores médios e os erros padrão da média foram calculados a partir de três experiências independentes.

4.2 – Determinação dos valores de CI₅₀

O estudo comparativo da suscetibilidade de *Leishmania* aos derivados da betulina e do ácido betulínico foi realizado através da determinação dos valores das concentrações inibitórias a 50% (CI₅₀) da viabilidade das promastigotas de *L. infantum*. Os valores foram calculados a partir das curvas dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 5 (Tabela IV). Apenas foi possível obter valores de CI₅₀ para os derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13, uma vez que apresentaram valores de inibição da viabilidade superiores a 50%. O derivado BT06 apresenta um valor de CI₅₀ de 50,8 µM e o derivado AB13 foi mais eficaz, com um valor de CI₅₀ de 25,8 µM.

Tabela IV – Concentração inibitória a 50% (CI₅₀) dos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*.

	CI ₅₀ μM (IC)*	R ²
BT06	50,8 (46,9 – 54,9)	0,85
AB13	25,8 (23,3 - 28,7)	0,92

*IC, intervalo de confiança a 95%.

Como controlo positivo de atividade anti-*Leishmania* foi determinado o valor de CI₅₀ da miltefosina, um dos fármacos usados no tratamento das leishmanioses. Verificou-se que a espécie *L. infantum* usada nos ensaios foi sensível à miltefosina com CI₅₀ de 7,6 μM, valor concordante com o descrito na literatura (Khademvatan *et al.*, 2011).

4.3 – Combinação entre os derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 e a miltefosina

Para cada um dos derivados mais ativos (BT06 e AB13), três combinações com miltefosina em concentrações fixas foram testadas. Verificou-se um aumento na inibição da viabilidade das promastigotas de *L. infantum* para todas as combinações, em relação ao respetivo derivado quando testado isoladamente (Fig. 15).

As figuras 16 e 17 mostram as diferenças estatísticas entre os efeitos das combinações dos derivados BT06 e AB13 com a miltefosina relativamente aos efeitos observados com os derivados e a miltefosina isoladamente.

As combinações do BT06 com a miltefosina induzem uma redução significativa da viabilidade de promastigotas relativamente à atividade do BT06, com exceção da combinação entre BT06 a 10 μM e miltefosina a 2 μM (Fig. 16 A). Quando se avalia o efeito das combinações em relação ao efeito da miltefosina isolada, apenas ocorrem efeitos estatisticamente significativos nas combinações de miltefosina a 4 μM e BT06 a 30 μM e miltefosina a 8 μM com o BT06 a 10, 20 e 30 μM (Fig. 16 B).

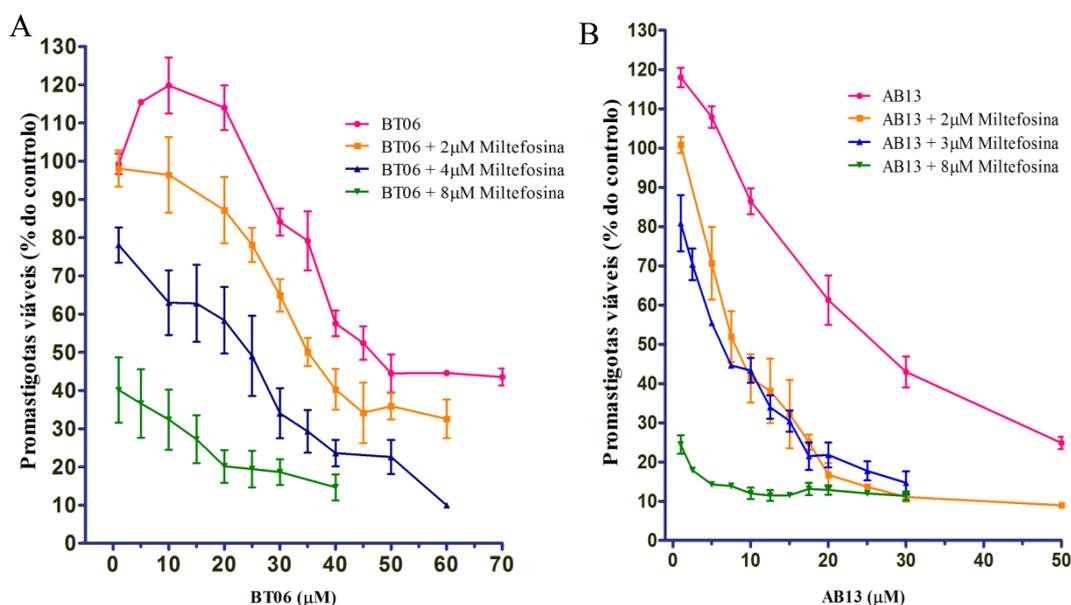


Figura 15 – Efeito dos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13), isolados ou em combinação com miltefosina, na inibição da viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*. Culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubadas a 26°C durante 24h, nas diferentes concentrações dos derivados e da miltefosina. (A) BT06; (B) AB13. Os valores médios e os erros padrão foram calculados a partir de três ensaios diferentes.

A diminuição da percentagem de promastigotas viáveis na presença das combinações AB13 e miltefosina foi significativamente diferente em relação aos efeitos do AB13 (Fig. 17 A) e da miltefosina (Fig. 17 B) quando testados isoladamente. Para todas as concentrações testadas, os efeitos foram estatisticamente muito significativos (**p < 0,01 e ***p < 0,001).

Os valores das concentrações inibitórias a 50% (CI₅₀) na viabilidade das promastigotas de *L. infantum*, das combinações do BT06 e AB13 com a miltefosina estão representados na tabela V. As combinações revelaram-se mais eficazes que os derivados isolados. A combinação BT06 miltefosina a 2 μM e 4 μM induziu uma diminuição do valor de CI₅₀ de 50,8 μM para 30,1 μM e 25,9 μM, respetivamente. A combinação AB13 e miltefosina a 2 μM e 3 μM reduziu o CI₅₀ do AB13 de 25,8 μM para 7,6 μM e 6,0 μM, respetivamente (Tabela V, Fig. 18).

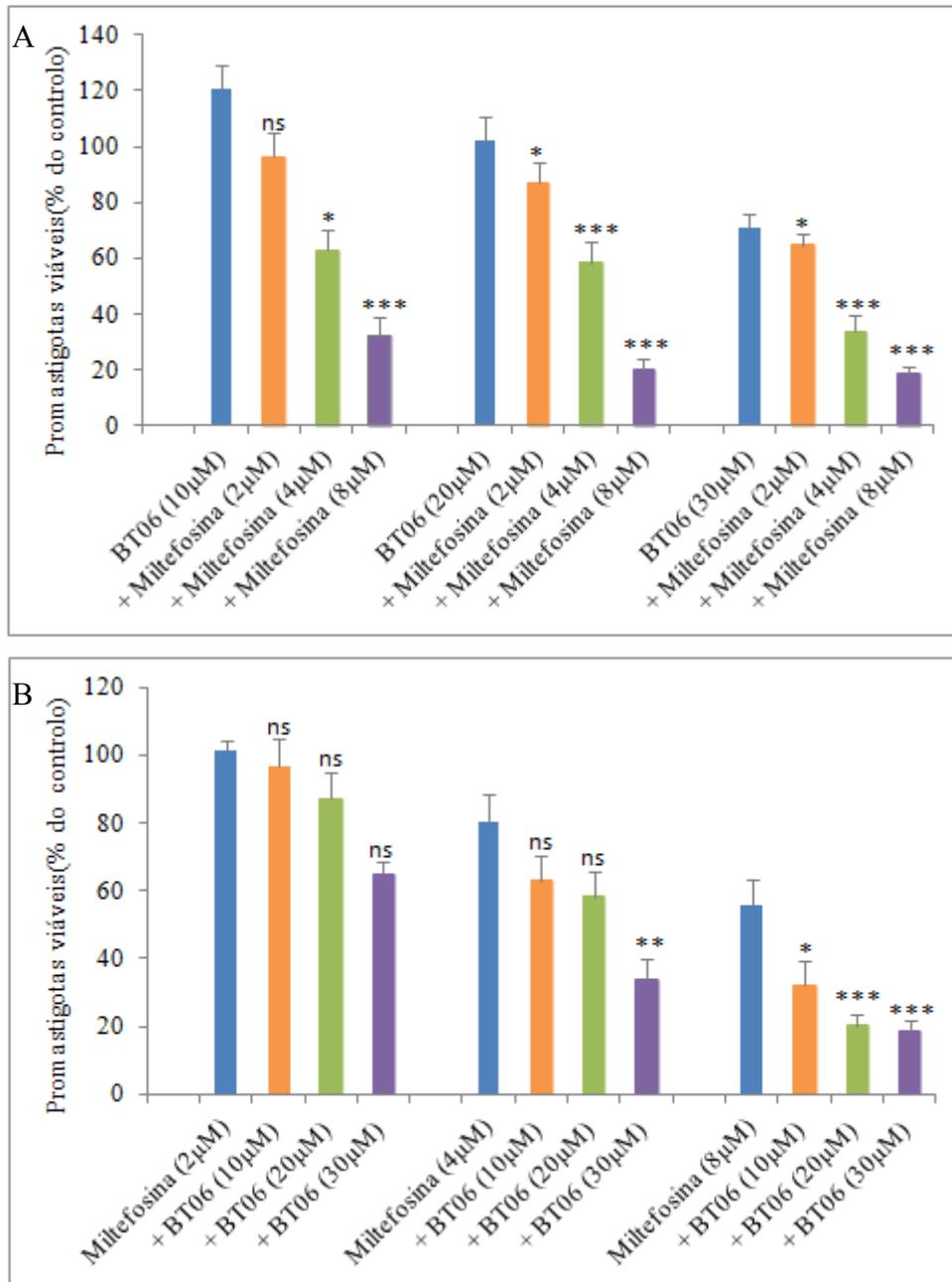


Figura 16 – Comparação dos efeitos das combinações entre BT06 e miltefosina com os de BT06 isolado (A) e miltefosina isolada (B). As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células. ml^{-1}) foram incubadas a 26°C durante 24h. Nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

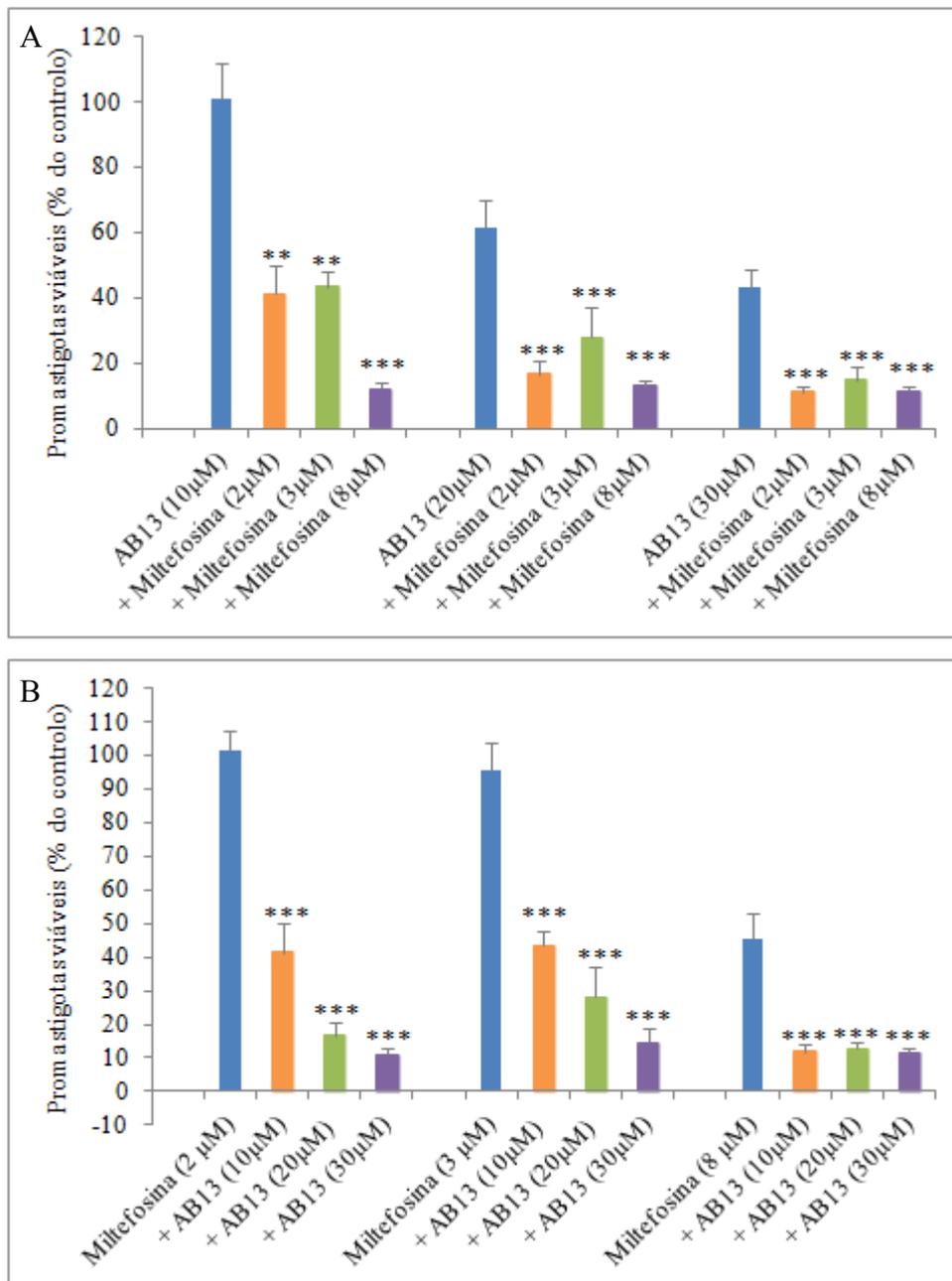


Figura 17 – Comparação dos efeitos das combinações entre AB13 e miltefosina com os de AB13 isolado (A) e miltefosina isolada (B). As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células. ml^{-1}) foram incubadas a 26°C durante 24h. Nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela V - Concentração inibitória a 50% (CI₅₀) dos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 associados com a miltefosina em promastigotas de *Leishmania infantum*.

	Combinação	CI ₅₀ μM (IC)*	R ²
BT06		50,8 (46,9 – 55,0)	0,85
	+ miltefosina 2μM	30,1 (27,2 – 33,4)	0,94
	+ miltefosina 4μM	25,9 (20,1 – 33,3)	0,81
AB13		25,8 (23,3 – 28,7)	0,92
	+ miltefosina 2μM	7,6 (5,8 – 10,0)	0,87
	+ miltefosina 3μM	6,0 (5,32 – 6,7)	0,93
Miltefosina		7,6 (6,64 – 8,8)	0,93

* IC, intervalos de confiança a 95%

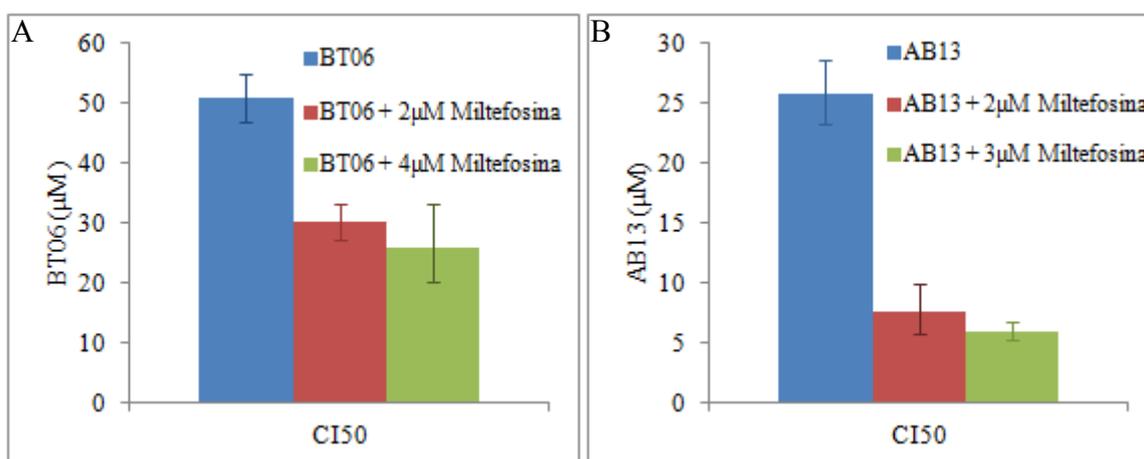


Figura 18 – Concentração inibitória a 50% (CI₅₀) dos derivados BT06 (A) e AB13 (B), isolados ou em combinação com miltefosina. Os valores foram determinados através de uma análise de regressão dose-resposta, no programa GraphPad Prism 5.

O tipo de associação entre o derivado da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 com a miltefosina foi avaliado recorrendo à análise isoblográfica (Denizot *et al.*, 1986; Twentyman & Luscomb, 1987).

O resultado da associação entre os derivados e a miltefosina é de natureza sinérgica, apresentando valores de CI₅₀ experimentais significativamente abaixo dos valores teóricos (Fig. 19 e 20).

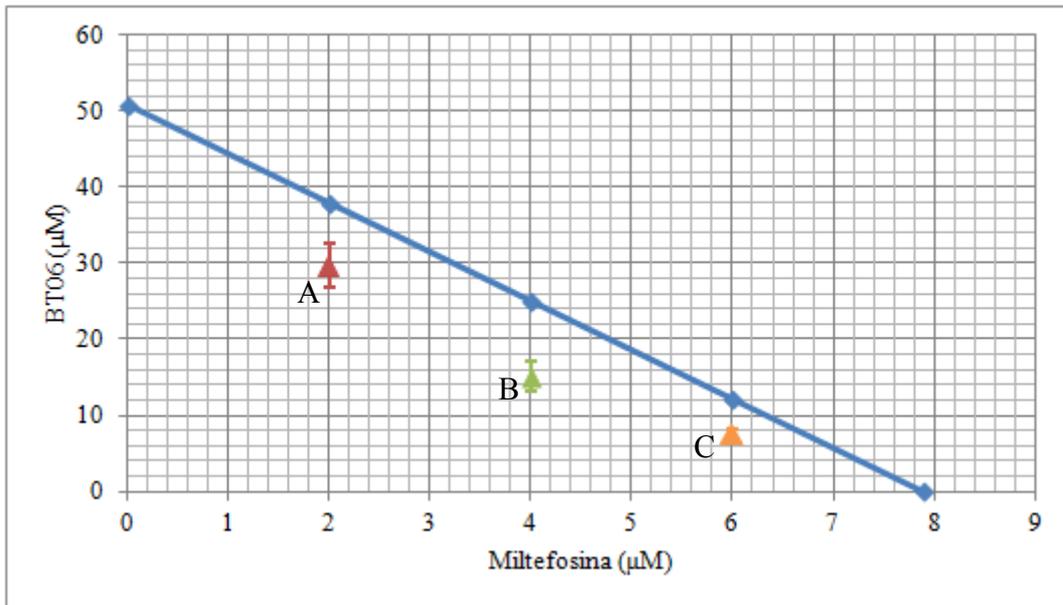


Figura 19 – Análise isoblográfica da combinação BT06 e miltefosina. A linha isoblográfica representa os valores CI_{50} aditivos teóricos. A associação é sinérgica, antagonista ou aditiva quando os pontos se localizam abaixo, acima ou na linha, respetivamente. (A) BT06 e 2µM miltefosina; (B) BT06 e 4µM miltefosina; (C) BT06 e 6µM miltefosina

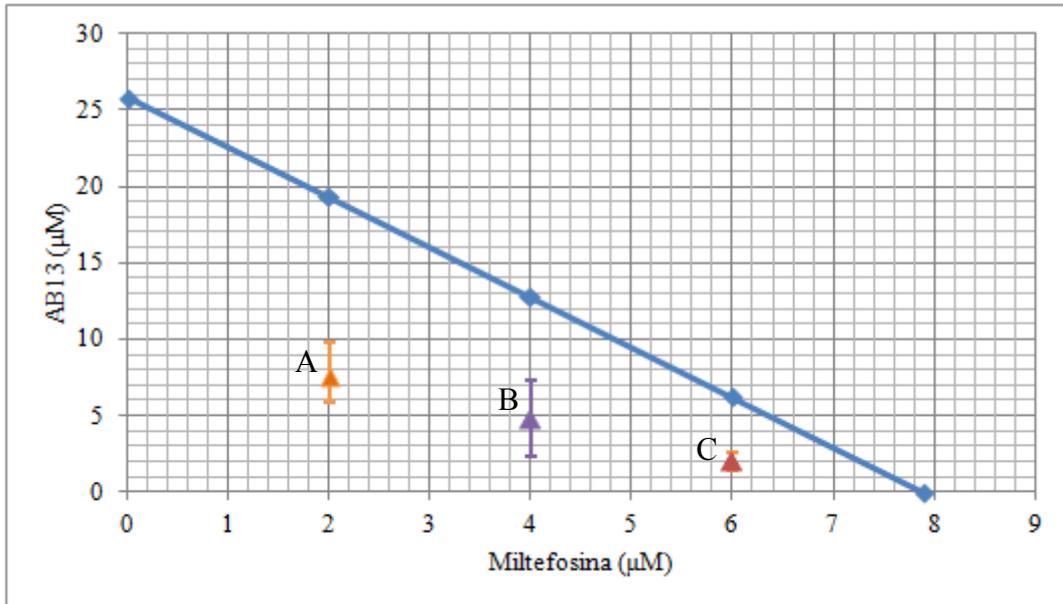


Figura 20 – Análise isoblográfica da combinação AB13 e miltefosina. A linha isoblográfica representa os valores CI_{50} aditivos teóricos. A associação é sinérgica, antagonista ou aditiva quando os pontos se localizam abaixo, acima ou na linha, respetivamente. (A) AB13 e 2µM miltefosina; (B) AB13 e 4µM miltefosina; (C) AB13 e 6µM miltefosina

4.4 – Alterações morfológicas observadas em microscopia ótica

As alterações morfológicas induzidas pelos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos (BT06 e AB13) em promastigotas de *L. infantum* foram avaliadas por observação em microscopia ótica de contraste de fases e microscopia ótica após coloração de Giemsa.

O estudo em microscopia ótica de contraste de fases permitiu observar a forma, tamanho, refringência e mobilidade das promastigotas de *Leishmania*. As células controlo apresentaram-se muito móveis e com forma fusiforme característica (Fig. 21 e 22 A, E, I). Em microscopia ótica após coloração com Giemsa, as promastigotas apresentam uma forma característica, um flagelo comprido a emergir da região anterior do parasita, núcleo central e cinetoplasto posterior ao núcleo (Fig. 21 e 22 C, G, K).

Com o derivado BT06 não se observaram alterações morfológicas significativas em microscopia de contraste de fase (Fig. 21 B, F, J) e após coloração com Giemsa (Fig. 21 D, H, L).

O derivado AB13 induziu alterações morfológicas relevantes a partir das 4 horas de incubação (Fig. 22 B). De facto, as formas promastigotas ficaram progressivamente mais pequenas e redondas e ao fim das 24 horas as alterações foram drásticas, verificando-se um predomínio das promastigotas com formas redondas, pequenas e com pouca mobilidade (Fig. 22 J). O estudo em microscopia ótica após coloração com Giemsa, permitiu verificar que as promastigotas de *L. infantum* expostas ao derivado AB13 apresentaram-se mais pequenas, arredondadas e com alterações no tamanho do flagelo (Fig. 22 D, H, L). Alterações estas particularmente notórias a partir as 6 horas de incubação (Fig. 22 H) e com efeitos drásticos após a incubação de 24 horas (Fig. 22 L).

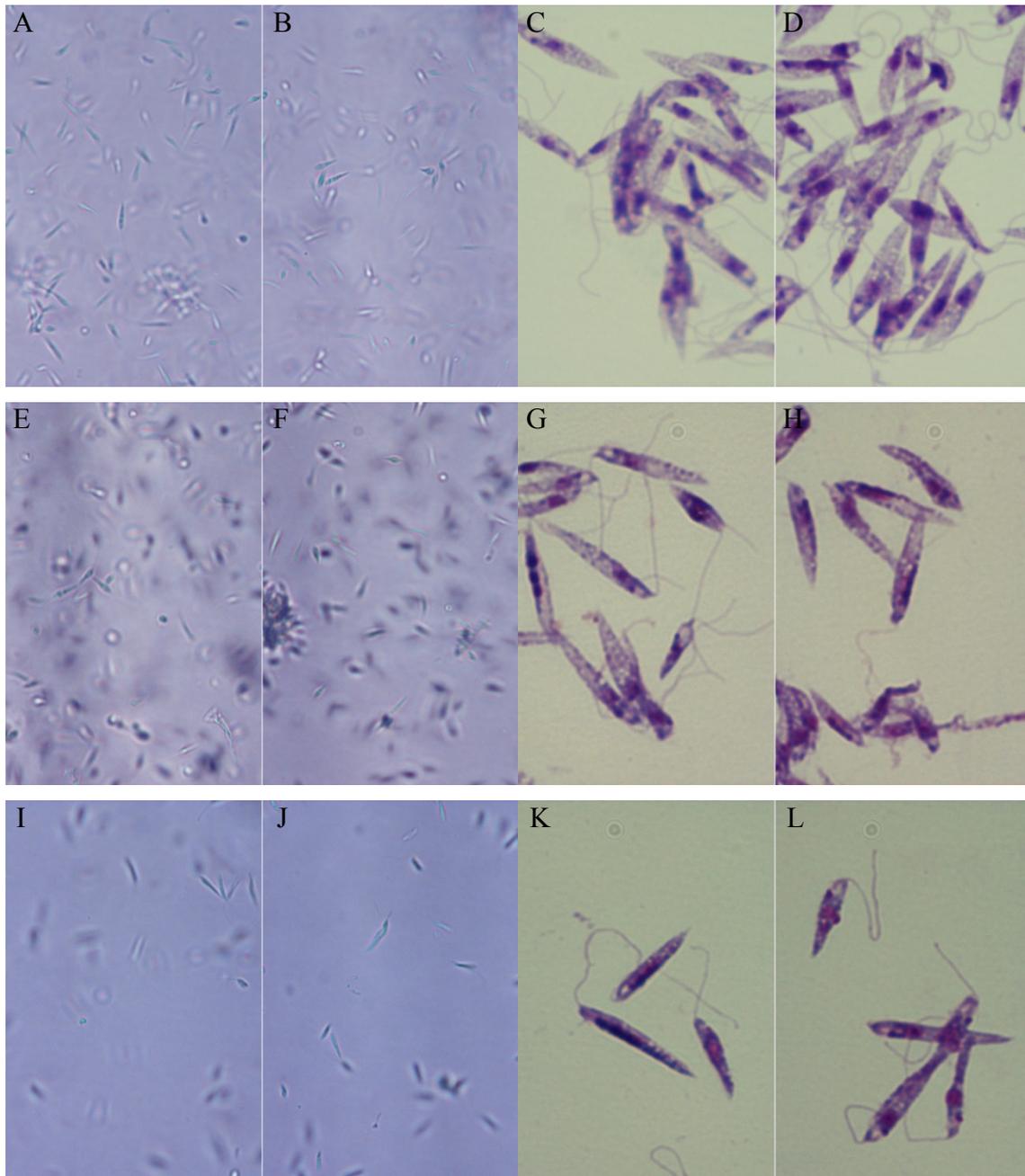


Figura 21 – Observação por microscopia ótica das promastigotas de *Leishmania infantum* na ausência e presença do derivado da betulina BT06. Preparação a fresco em contraste de fases (A, B, E, F, I, J, ampliação 200x) e após coloração com Giemsa (C, D, G, H, K, L, ampliação 1000x). Células controle incubadas com DMSO a 26°C durante 4h (A, C), 6h (E, G) e 24h (I, K). Células expostas ao derivado BT06 e incubadas a 26°C durante 4h (B, D), 6h (F, H) e 24h (J, L). Todas as células apresentam forma fusiforme típica, núcleo, cinetoplasto, flagelo anterior comprido e elevada mobilidade.

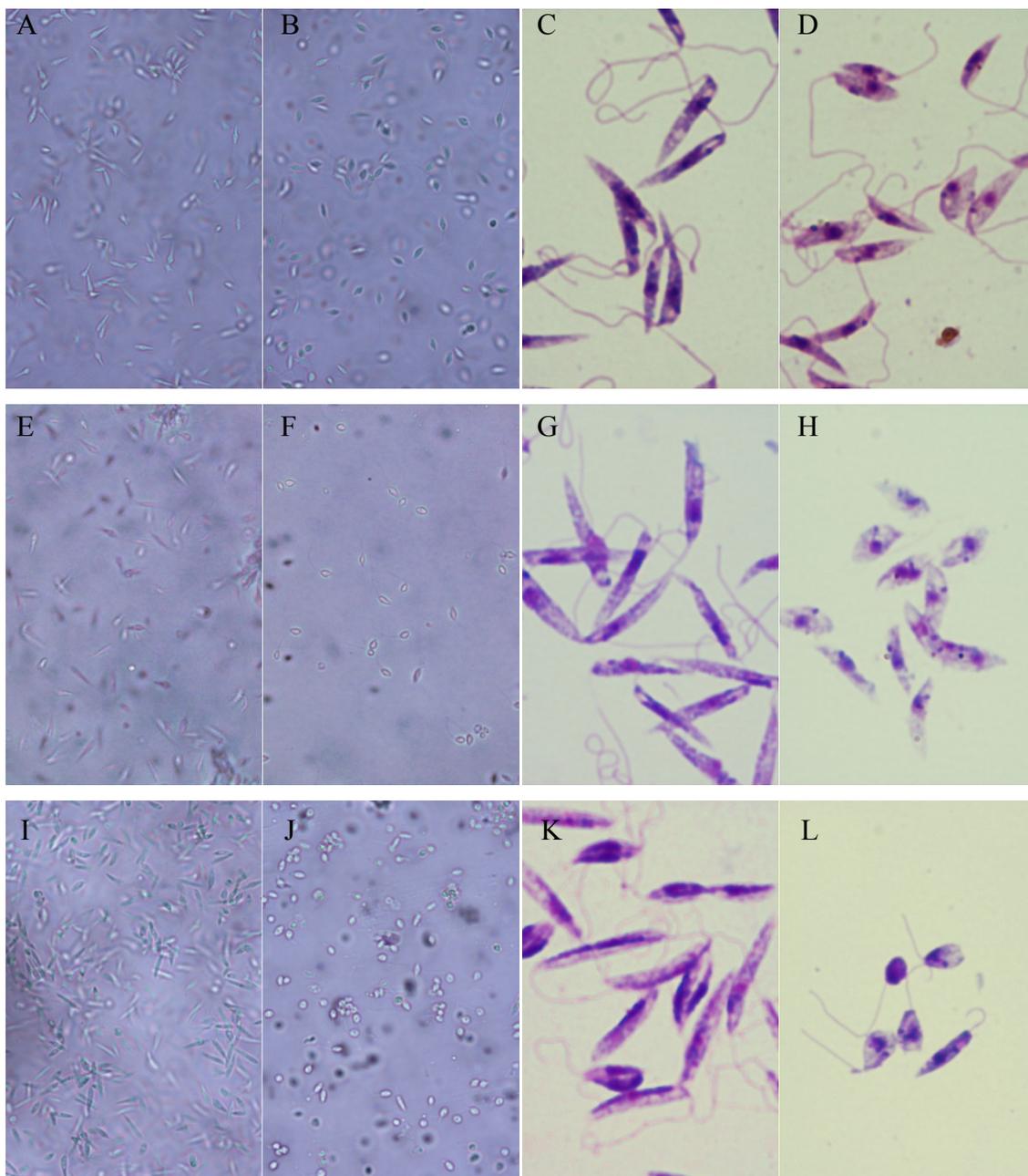


Figura 22 – Observação por microscopia ótica das promastigotas de *Leishmania infantum* na ausência e presença do derivado do ácido betulínico AB13. Preparação a fresco em contraste de fases (A, B, E, F, I, J, ampliação 200x) e após coloração com Giemsa (C, D, G, H, K, L, ampliação 1000x). Células controlo incubadas com DMSO a 26°C durante 4h (A, C), 6h (E, G) e 24h (I, K); as promastigotas apresentam forma fusiforme típica, núcleo, cinetoplasto, flagelo anterior comprido e elevada mobilidade. Células expostas ao derivado AB13 e incubadas a 26°C durante 4h (B, D), 6h (F, H) e 24h (J, L); as promastigotas apresentam-se mais pequenas, redondas, com flagelo mais curto e pouca mobilidade.

4.5 – Estudo da integridade do ADN

A análise da integridade do ADN foi avaliada por eletroforese em gel de agarose após tratamento das promastigotas de *L. infantum* com a concentração respetiva CI_{50} dos derivados mais ativos (BT06 e AB13) e posterior extração dos ADNs genómicos.

Como se pode observar na figura 23, após a exposição das células ao BT06 e AB13 não se verificou fragmentação do ADN. De facto, as bandas de ADN das células tratadas (linhas 3 e 6) estão íntegras e na mesma posição migratória em relação aos respetivos controlos (linhas 2 e 5), acima das 12000 pares de bases.

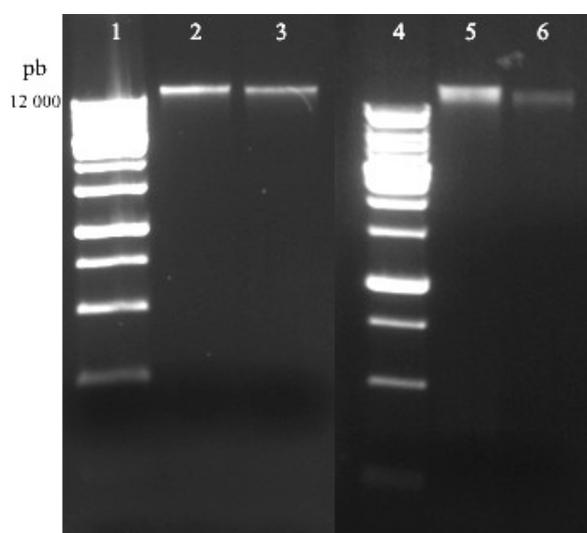


Figura 23 – Eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio dos ADNs genómicos de promastigotas de *L. infantum* após tratamento com os derivados BT06 e AB13 na respetiva concentração CI_{50} .
Linhas 1 e 4 – Marcador de massa molecular (*1Kb plus DNA Ladder*TM);
Linhas 2 e 5 – ADN de células controlo; Linha 3 – ADN de células expostas ao BT06; Linha 6 – ADN de células expostas ao AB13.

4.6 – Paragem do ciclo celular de promastigotas de *L. infantum* na fase G0/G1

A distribuição das promastigotas de *L. infantum* pelas diferentes fases do ciclo celular foi avaliada através da quantificação do conteúdo de ADN por citometria de fluxo.

A tabela VI mostra a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M, em função do tempo de incubação e do tratamento com BT06 e AB13 a concentrações de CI₅₀.

Durante as primeiras horas de incubação, das 2 às 6 horas, as promastigotas expostas ao BT06 e AB13 distribuem-se pelas diferentes fases do ciclo celular de forma semelhante aos controlos respetivos. Contudo, às 24 horas de incubação a distribuição das células pelas fases G0/G1, S e G2/M mostra diferenças significativas (Fig. 24). O BT06 induziu um aumento de 1,5x no número de células na fase G0/G1 (de 44,2% para 67,7%) (Tabela VI). Em relação ao derivado AB13, os efeitos foram mais significativos com um aumento de 2x no número de células em G0/G1 (48% para 81,2%). No mesmo período as percentagens das promastigotas nas fases S e G2/M são significativamente inferiores nos ensaios com os derivados da betulina e do ácido betulínico.

Os resultados parecem indicar uma diminuição da multiplicação celular na presença de BT06 e AB13 verificando-se uma inibição na progressão do ciclo celular ficando as promastigotas retidas na fase G0/G1. Este efeito foi mais pronunciado com o derivado AB13.

Tabela VI – Efeitos dos derivados BT06 e AB13 nas concentrações CI₅₀ no ciclo celular de *Leishmania infantum*, ao longo do tempo de incubação.

	Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (% do total de células)											
	Fase G0/G1				Fase S				Fase G2/M			
	2h	4h	6h	24h	2h	4h	6h	24h	2h	4h	6h	24h
Controlo BT06	83,6	90,7	72	44,2	16,5	9,9	28	33,7	0	0	0	22,1
BT06	92,9	91,8	72,5	67,7	7,1	6,8	28	25,7	0	0	0	6,7
Controlo AB13	75,9	75,3	75,5	48	24,1	24,5	24,5	30	0	0	0	22
AB13	70,6	75,8	60,9	81,2	29,2	24,2	39,1	18,8	0	0	0	0

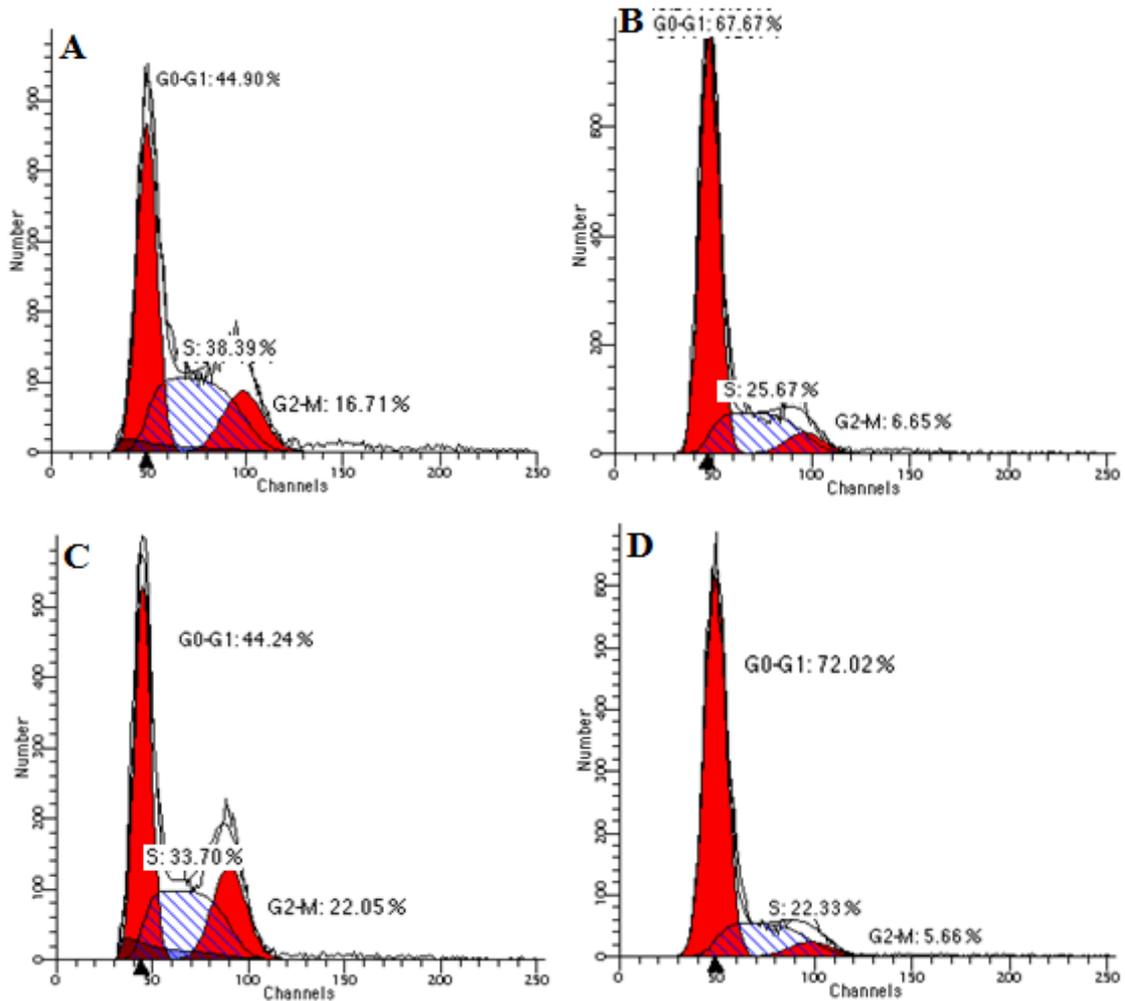


Figura 24 – Histogramas representativos do conteúdo de ADN das promastigotas de *Leishmania infantum* expostas aos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13). As promastigotas foram incubadas durante 24h na ausência ou presença dos derivados nas concentrações CI_{50} . As células foram marcadas com IP e analisadas por citometria de fluxo. (A) controlo de BT06; (B) BT06; (C) controlo de AB13; (D) AB13.

4.7 – Estudo da apoptose/necrose

A ocorrência de apoptose e/ou necrose nas promastigotas de *L. infantum*, expostas aos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13, foi avaliada recorrendo à marcação das células com anexina-V e iodeto de propídio e posterior quantificação das células marcadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas para determinada marcação, relativamente ao número de células totais analisadas.

As culturas de *L. infantum* expostas ao BT06 e ao AB13 não apresentaram ao longo do tempo de incubação diferenças significativas nas células marcadas com anexina-V e IP quando comparadas com os respectivos controlos (Tabela VII).

Estes resultados sugerem que não ocorre morte significativa por apoptose e necrose avaliada por estes parâmetros, no tempo de ensaio.

Tabela VII – Promastigotas de *Leishmania infantum* marcadas com anexina-V e IP após exposição aos derivados BT06 e AB13 nas concentrações CI_{50} ao longo do tempo de incubação.

	Promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (% do total de células)											
	Anexina				IP				Anexina/IP			
	2h	4h	6h	24h	2h	4h	6h	24h	2h	4h	6h	24h
Controlo BT06	3,8	2	1,6	1,5	0,6	1,2	0,7	0,9	0,7	0,4	0,4	0,6
BT06	1,2	2,5	2,6	1,5	0,5	1,4	0,9	0,5	0,5	0,9	0,6	0,2
Controlo AB13	18,8	6,3	3,3	2,4	0,4	0,3	0	0,4	3,7	1,5	0,4	0,7
AB13	17,7	3,4	4,5	2,6	0,1	0	0,2	0	1,9	0,1	0,9	0,6

4.8 – Citotoxicidade em células de mamífero

A citotoxicidade dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos em *Leishmania* foi avaliada em linhas celulares de macrófagos, recorrendo ao teste do MTT, após incubação com as respetivas concentrações CI_{50} . Dos dois derivados testados (BT06 e AB13), nenhum induziu toxicidade celular (Fig. 25).

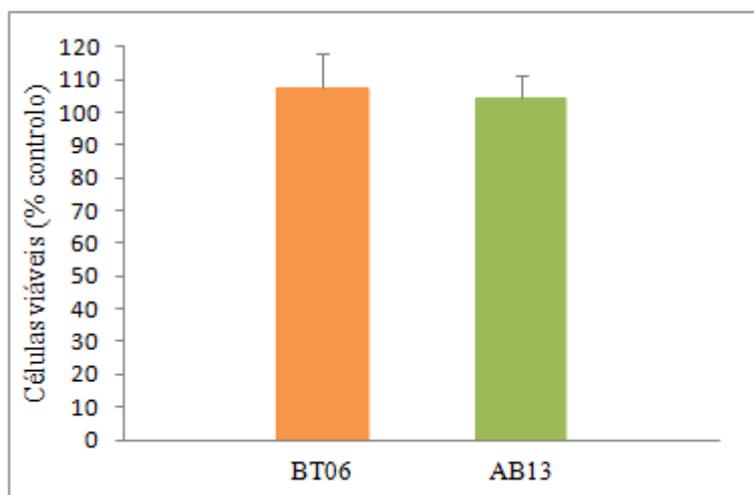


Figura 25 – Citotoxicidade dos derivados da betulina (BT06) e do ácido betulínico (AB13) em macrófagos (RAW 264.7).

Capítulo 5
Discussão

5 – Discussão

A leishmaniose é a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias, afetando 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença apresenta diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* infetante, da relação parasita e hospedeiro e do estado imunológico do hospedeiro. A forma mais severa é a leishmaniose visceral, com uma taxa de morte de aproximadamente 100% para casos não tratados (WHO, 2010). O tratamento é assim, muito importante no controlo destas infeções. Contudo, a terapêutica é de longa duração e os fármacos disponíveis são muitas vezes ineficazes, tóxicos e associados a resistência (Croft *et al.*, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos para a leishmaniose continua a ser um desafio importante.

Estudos anteriores revelaram atividade anti-*Leishmania* de compostos naturais e seus derivados sintéticos (Monzote *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010; González-Coloma *et al.*, 2012). Entre os compostos naturais encontram-se os triterpenos betulina e ácido betulínico, que para além de apresentarem atividades anticancerígenas, anti-VIH e anti-inflamatórias também revelaram atividade antiparasitária, nomeadamente anti-*Leishmania* (Alakurtti *et al.*, 2006; Alakurtti *et al.*, 2010; Domínguez-Carmona *et al.*, 2010).

Considerando o potencial dos derivados da betulina e do ácido betulínico, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-*Leishmania* de 16 derivados sintéticos da betulina (BT06 a BT09) e do ácido betulínico (AB10 a AB16), seguindo-se um estudo das associações dos derivados mais ativos com a miltefosina, fármaco utilizado na terapêutica das leishmanioses. Foi também objetivo estudar os mecanismos de ação farmacológica e toxicológica dos compostos mais ativos de forma a elucidar possíveis alvos moleculares de atividade anti-*Leishmania*.

A atividade dos derivados em *L. infantum* foi avaliada através de estudos de viabilidade celular. Todos os derivados, à exceção de AB12, apresentaram atividade anti-*Leishmania*. No entanto, dos 16 derivados testados apenas para dois foi possível obter valores de inibição a 50% (CI₅₀). Os compostos mais ativos foram o derivado da betulina BT06 e o derivado do ácido betulínico AB13, apresentando valores de CI₅₀ de 50,8 µM e 25,8 µM, respetivamente. A atividade superior do AB13 está de acordo com resultados publicados que referem uma maior atividade dos derivados do ácido betulínico em relação aos derivados da betulina (Alakurtti *et al.*, 2006; Santos *et al.*,

2010). De acordo com a reação de adição de Michael (Sporn *et al.*, 2011), um dos mecanismos de ação biológica possível do BT06 e do AB13 poderá estar relacionado com o ataque nucleofílico (reação de adição de Michael- tio- ou aza) de grupos tióis ou outros nucleófilos fisiológicos ao grupo imidazole carbamato ligado ao C28 do derivado BT06 (Anexo 1) e ao grupo cetona α - β -insaturada (no C1 do anel A) do derivado AB13 (Anexo 1). A actividade anti-*Leishmania* superior do AB13 estaria assim, associada à maior capacidade de aceitação dos electrões/nucleofílicos deste derivado.

Na literatura são poucos os trabalhos que referem a atividade de derivados da betulina e do ácido betulínico em *Leishmania*. Alakurtti e colaboradores (2010) determinaram a atividade em amastigotas de *Leishmania donovani* de derivados sintéticos da betulina e do ácido betulínico, apresentando valores de CI_{50} de 8,9 a 30 μ M. Dominguez-Carmona e colaboradores (2010) verificaram atividade do acetato do ácido betulínico (CI_{50} de 44,9 μ M) em promastigotas de *L. amazonensis* e do estér metílico do ácido betulínico (CI_{50} de 69,9 μ M).

Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho, conclui-se que os derivados AB13 e BT06 apresentam atividade semelhante a alguns dos derivados descritos. No entanto, deve-se ter em atenção aos modelos celulares utilizados, promastigotas ou amastigotas, bem como às espécies de *Leishmania* testadas. Quando se utilizam as formas amastigotas de *Leishmania* nos ensaios de suscetibilidade, os valores de CI_{50} são geralmente mais baixos quando comparados com os obtidos em promastigotas (Vermeersch *et al.*, 2009). Assim, tudo indica que os derivados BT06 e AB13 possam possuir uma atividade superior em amastigotas.

O aparecimento de resistência aos fármacos pode ser prevenido ou pelo menos atrasado recorrendo a uma terapêutica combinada. Assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a natureza da combinação entre os derivados mais ativos (BT06 e AB13) e a miltefosina, fármaco usado no tratamento da leishmaniose.

As combinações BT06/miltefosina e AB13/miltefosina revelaram-se mais eficazes na diminuição da viabilidade das promastigotas em relação aos derivados isolados (Fig. 15). Observou-se uma redução dos valores de CI_{50} do derivado BT06 de 1,5 a 2 vezes (25,9 a 30,1 μ M) e do derivado AB13 de 3 a 4 vezes (6,0 a 7,6 μ M), dependendo das combinações (Tabela V).

A associação AB13 e miltefosina é a mais eficaz, observando-se elevada significância estatística (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) em todas as combinações quando comparadas com os efeitos do derivado e da miltefosina isolados (Fig. 17). No entanto,

a análise isobolográfica das combinações mostrou que a natureza das associações de BT06 e AB13 com miltefosina são todas sinérgicas (Fig. 19 e 20).

O efeito sinérgico da associação BT06 e miltefosina parece resultar de uma potenciação do derivado na presença da miltefosina (Fig. 16). Em relação à combinação AB13 e miltefosina, tudo indica que o efeito sinérgico resulta de uma potenciação recíproca (Fig. 17).

As vantagens da terapêutica combinada incluem o aumento da eficácia das drogas, diminuição da dosagem, diminuição da toxicidade e um atraso ou prevenção do aparecimento de resistência ao fármaco (Croft *et al.*, 2006). Neste sentido, como os derivados mostram sinérgismo com a miltefosina, apresentam-se como moléculas promissoras a aplicar no desenvolvimento de novas terapêuticas combinadas para a leishmaniose.

No desenvolvimento de novas moléculas é importante que uma atividade anti-*Leishmania* promissora não confira toxicidade para as células do hospedeiro. Muitos dos compostos que se apresentam inicialmente como promissores acabam por apresentar citotoxicidade em células do hospedeiro, não prosseguindo para avaliação clínica. Assim, no presente trabalho foi avaliada a toxicidade dos derivados mais ativos em linhas celulares de macrófagos. Tanto o derivado BT06 como o AB13 não foram citotóxicos para os macrófagos.

Com o presente trabalho, propôs-se também estudar mecanismos responsáveis pela atividade biológica dos derivados mais ativos em *Leishmania*. Para tal, foram realizados estudos morfológicos, avaliação da morte celular por apoptose/necrose e avaliação do ciclo celular, na presença das concentrações CI_{50} .

No estudo morfológico em microscopia ótica de contraste de fases e após coloração de Giemsa não se observaram alterações significativas nas promastigotas submetidas ao tratamento por BT06. No entanto, as promastigotas expostas ao AB13 sofreram alterações morfológicas significativas em relação ao controlo. Estas células apresentaram uma notória diminuição da mobilidade, sendo possível observar alterações no tamanho do flagelo e na forma das promastigotas, apresentando-se mais arredondadas (Fig. 22). Estes efeitos podem sugerir que os mecanismos induzidos pelo derivado AB13 poderão estar associados a alterações na organização e funções do citoesqueleto e/ou na atividade bioenergética da mitocôndria.

A morte celular por apoptose/necrose foi avaliada por citometria de fluxo, recorrendo à marcação com Anexina V/IP e através do estudo da integridade do ADN.

As células tratadas com os derivados BT06 e AB13 não apresentaram morte significativa no tempo de ensaio (Fig. 23; Tabela VII).

No entanto, ambos os derivados promoveram a retenção das promastigotas de *L. infantum* na fase G0/G1 do ciclo celular sugerindo uma paragem no ciclo nesta fase. Observou-se uma redução acentuada na duplicação do ADN e na mitose, com diminuição no número de células na fase G2/M e fase S, principalmente com o derivado AB13 (Fig. 24; Tabela VI). A inibição da proliferação das promastigotas de *L. infantum* parece assim representar um mecanismo principal de atividade dos derivados BT06 e AB13.

As cinases dependentes de ciclinas têm um papel crucial no ciclo de divisão celular, transcrição, apoptose e diferenciação (Cleghorn *et al.*, 2011). Em *Leishmania* já foram identificadas diversas cinases e ciclinas com diferenças significativas em relação às humanas, sendo consideradas como um novo alvo terapêutico (Singh *et al.*, 2012).

Atendendo aos resultados obtidos no presente trabalho, paragem no ciclo celular, propomos no futuro avaliar os efeitos dos derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 na atividade das cinases dependentes de ciclinas de *Leishmania*.

Adicionalmente, as topoisomerases do ADN são consideradas um importante alvo terapêutico, actuando na remoção do *stress* torsional da molécula de ADN através da quebra e ligação de uma (topoisomerase tipo I) ou de ambas as cadeias (topoisomerase tipo II). Determinadas drogas anticancerígenas têm como alvo de ação as topoisomerases de ADN, inativando a integridade genética e a sobrevivência celular. A topoisomerase tipo II é muito importante em *Leishmania* devido à existência de centenas de minicírculos no cinetoplasto (Singh *et al.*, 2012). Os derivados da betulina BT06 e do ácido betulínico AB13 apresentaram previamente atividade anticancerígena com inibição da topoisomerase tipo I de ADN (Santos *et al.*, 2010), indução da paragem do ciclo celular e apoptose mediada pela ativação das caspases 3 e 9 (Santos *et al.*, 2011). Uma vez que estes derivados podem ter mecanismos de ação análogos em *Leishmania*, será importante também avaliar os efeitos destes dois compostos na atividade da topoisomerase tipo II de ADN em *Leishmania*.

Capítulo 6
Conclusão

6 – Conclusão

Os estudos que avaliaram o efeito dos 16 derivados da betulina e do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas, permitiram identificar os derivados com maior atividade anti-*Leishmania*, BT06 e AB13.

As combinações da miltefosina com cada um dos derivados (BT06 e AB13) foram mais eficazes que os compostos isolados, apresentando efeitos sinérgicos.

As promastigotas de *L. infantum* sofreram paragem do ciclo celular por retenção das células na fase G0/G1, quando incubadas com BT06 e AB13 nas respetivas concentrações CI₅₀. Esta inibição de proliferação pode representar um dos mecanismos de ação dos derivados.

Os ensaios de citotoxicidade realizados em células de mamífero (macrófagos) permitiram concluir que os derivados BT06 e AB13 não apresentarão riscos de toxicidade para o hospedeiro.

Este trabalho permitiu ainda estabelecer o derivado do ácido betulínico AB13 como o mais eficaz, representando a molécula mais promissora a aplicar no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas da leishmaniose, nomeadamente em terapêutica combinada.

Referências Bibliográficas

- Ahasan, H. A., Chowdhury, M. A., Azhar, M. A., Rafiqueuddin, A. K., & Azad, K. A. (1996). Deaths in visceral leishmaniasis (Kala-azar) during treatment. *The Medical Journal of Malaysia*, 51(1), 29-32.
- Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., & Sereno, D. (2011). *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitology research*, 109(5), 1225-32.
- Alakurtti, S., Mäkelä, T., Koskimies, S., & Yli-Kauhaluoma, J. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European journal of pharmaceutical sciences*, 29(1), 1-13.
- Alakurtti, S., Heiska, T., Kiriazis, A., Sacerdoti-Sierra, N., Jaffe, C. L., & Yli-Kauhaluoma, J. (2010). Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(4), 1573-1582.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*, 14(5), 523-532.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1269-1281.
- Baglin, I., Mitaine-Offer, A.-C., Nour, M., Tan, K., Cavé, C., & Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). A review of natural and modified betulonic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3(6), 525-539.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C., & Ordóñez, D. (1998). The Pharmacology of Leishmaniasis. *General Pharmacology*, 30(4), 435-443.
- Barlogie, B., Raber, M. N., Schumann, J., Johnson, T. S., Drewinko, B., Swartzendruber, D. E., Göhde, W., Andreeff, M., & Freireich, E. J. (1983). Flow Cytometry in Clinical Cancer Research. *Cancer Research*, 43(9), 3982-3997.

- Bates, P. A. (2006). *Leishmania*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons Ltd. Disponível em <http://els.wiley.com/els>, acessado a 17 Maio 2012.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097-1106.
- Belhadj, S., Pratlong, F., Hammami, M., Kallel, K., Dedet, J. P., & Chaker, E. (2003). Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Tropica*, 85(1), 83-86.
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1063-1075.
- Berenbaum, M. C. (1977). Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. *Clinical and Experimental Immunology*, 28(1), 1-18.
- Campino, L., Bajanca, R., Franca, I., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Fiadeiro, T. (2005). Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 18(6), 475-478.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.-A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J. M., Afonso, M. O., & Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical medicine & international health*, 11(11), 1708-1714.
- Campino, L., & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23(5), 859-864.
- Chang, K.-P., & Mcgwire, B. S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1(1), 1-7.

- Cichewicz, R. H., & Kouzi, S. A. (2004). Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews*, 24(1), 90-114.
- Cleghorn, L. A. T., Woodland, A., Collie, I. T., Torrie, L. S., Norcross, N., Luksch, T., Mpmahanga, C., Walker R. G., Mottram J. C., Brenk R., Frearson J. A., Gilbert I. H., & Wyatt P. G. (2011). Identification of inhibitors of the *Leishmania* cdc2-related protein kinase CRK3. *ChemMedChem*, 6(12), 2214-2224.
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M., & Matheron, S. (2012). *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerging infectious diseases*, 18(4), 704-706.
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19(11), 502-508.
- Croft, S. L., Barrett, M. P., & Urbina, J. A. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 21(11), 508-12.
- Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 111-126.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., & Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 357-388.
- Dedet, J. P., Pratlong, F., Lanotte, G., & Ravel, C. (1999). The parasite. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 261-268.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.

- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), 239-43.
- Desjeux, P., & Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97(1), 3-15.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-18.
- Domínguez-Carmona, D. B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinell, G., Gutierrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M. J., Giménez-Turba, A., & Peña-Rodríguez, L. M. (2010). Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*, 17(5), 379-82.
- Duncan, R., Gannavaram, S., Dey, R., Debrabant, A., Lakhali-Naouar, I., & Nakhasi, H. L. (2011). Identification and characterization of genes involved in *Leishmania* pathogenesis: the potential for drug target selection. *Molecular biology international*, 2011(428486), 1-10.
- Engwerda, C. R., Ato, M., & Kaye, P. M. (2004). Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 20(11), 524-30.
- Filho, A. A. S., Resende, D. O., Fukui, M. J., Santos, F. F., Pauletti, P. M., Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Gregório, L. E., Bastos, J. K., & Nanayakkara, N. P. D. (2009). In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 80(8), 478-482.
- Gazanion, E., Vergnes, B., Seveno, M., Garcia, D., Oury, B., Ait-Oudhia, K., Ouaisi, A., & Sereno, D. (2011). In vitro activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations. *Parasitology international*, 60(1), 19-24.

- González-Coloma, A., Reina, M., Sáenz, C., Lacret, R., Ruiz-Mesia, L., Arán, V. J., Sanz, J. & Martínez-Díaz, R. A. (2012). Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology research*, 110(4), 1381-1392.
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027-1034.
- Grevelink, S. A., & Lerner, E. A. (1996). Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2 Pt 1), 257-272.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., & Bryceson, A. D. M. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8), 494-501.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185), 1191-1199.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*, 22(9), 439-45.
- Kappagoda, S., Singh, U., & Blackburn, B. G. (2011). Antiparasitic therapy. *Mayo Clinic proceedings*, 86(6), 561-583.
- Kazemi, B. (2011). Genomic organization of *Leishmania* species. *Iranian J Parasitol*, 6(3), 1-18.
- Khademvatan, S., Gharavi, M. J., & Saki, J. (2011). Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in *Leishmania infantum*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(5), 442-448.

- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, (4), 1-24.
- Kolaczinski, J. H. (2008). Kala-azar Epidemiology and Control, Southern Sudan. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 664-666.
- Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology*, 66(1), 188-193.
- Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E., Deroux G., Grain J., Honigberg B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E. G., Page F. C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., & Wallace F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1), 37-58.
- Machado, M., Santoro, G., Sousa, M. C., Salgueiro, L., & Cavaleiro, C. (2010). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 156-160.
- Mahoney, A. B., Sacks, D. L., Saraiva, E., Modi, G., & Turco, S. J. (1999). Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*, 38(31), 9813-9823.
- Mancini, M., Anderson, B. O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P. B., & Hockenbery, D. M. (1997). Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. *The Journal of Cell Biology*, 138(2), 449-469.
- Marques, N., Cabral, S., Sá, R., Coelho, F., Oliveira, J., Saraiva da Cunha, J. G., & Meliço-Silvestre, A. (2007). Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana - Na Era da Terapêutica Anti-Retroviral de Alta Eficácia. *Acta Médica Portuguesa*, 20(4), 291-298.

- McConville, M. J., Souza, D., Saunders, E., Likic, V. A., & Naderer, T. (2007). Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends in parasitology*, 23(8), 368-75.
- Meymandi, S. S., Javadi, A., Dabiri, S., Meymandi, M. S., & Nadji, M. (2011). Comparative Histological and Immunohistochemical Changes of Dry Type Cutaneous Leishmaniasis after Administration of Meglumine Antimoniate, Imiquimod or Combination Therapy. *Archives of Iranian Medicine*, 14(4), 238-243.
- Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., & Marty, P. (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta tropica*, 119(2-3), 69-75.
- Molina, R., Gradoni, L., & Alvar, J. (2003). HIV and the transmission of *Leishmania*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 97(1), 29-45.
- Monzote, L., Montalvo, A. M., Scull, R., Miranda, M., & Abreu, J. (2007). Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49(4), 257-260.
- Moore, E. M., & Lockwood, D. N. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 151-158.
- Moreira, D., López-García, P., & Vickerman, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1861-1875.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496), 1561-1577.

- Neuber, H. (2008). Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6(9), 754-765.
- Ormerod, M. G. (2002). Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 265(1-2), 73-80.
- Paredes, R., Munoz, J., Diaz, I., Domingo, P., Gurgui, M., & Clotet, B. (2003). Leishmaniasis in HIV infection. *Journal of Postgraduate Medicine*, 49(1), 39.
- Pereira, M., Afonso, O., Machado, M. & Sousa, M. (2009). Entomological survey of phlebotomine sand flies in a focus of visceral leishmaniasis in region centre of Portugal (Coimbra municipality). *Clinical Microbiology and Infection*, 15(S4),263.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M.-A., & Bendig, M. (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews: Drug discovery*, 4(9), 727-740.
- Pratlong, F., Rioux, J.-A., Marty, P., Faraut-Gambarielli, F., Dereure, J., Lanotte, G., & Dedet, J.-P. (2004). Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of *Leishmania infantum* in the South of France and Relationship of Enzymatic Polymorphism to Clinical and Epidemiological Features. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4077-4082.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. Obtido de Euro surveillance: <http://www.eurosurveillance.org>, acedido a 17 Maio 2012.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. & Brooker, S., (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581-596.

- Sacks, D. L., Pimenta, P. F. P., Mcconville, M. J., Schneider, P., & Turco, S. J. (1995). Stage-specific Binding of *Leishmania donovani* to the Sand Fly Vector Midgut Is Regulated by Conformational Changes in the Abundant Surface Lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(2), 685-697.
- Saliba, E. K., & Oumeish, O. Y. (1999). Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*, 17(3), 275-277.
- Santos, R. C., Salvador, J. A. R., Marín, S., & Cascante, M. (2009). Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(17), 6241-6250.
- Santos, R. C., Salvador, J. A. R., Marín, S., Cascante, M., Moreira, J. N., & Dinis, T. C. P. (2010). Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(12), 4385-4396.
- Santos, R. C., Salvador, J. A. R., Cortés, R., Pachón, G., Marín, S., & Cascante, M. (2011). New betulinic acid derivatives induce potent and selective antiproliferative activity through cell cycle arrest at the S phase and caspase dependent apoptosis in human cancer cells. *Biochimie*, 93(6), 1065-1075.
- Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*, 45(4), 255-72.
- Shaw, J. J. (1994). Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and Their Implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3), 471-478.
- Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V. F., Simpson, A. M., Feagin, J. E., Jasmer, D. P., & Stuart, K. (1987). Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(13), 6182-6196.

- Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(6), 485-97.
- Sinha, P. K., Pandey, K., & Bhattacharya, S. K. (2005). Diagnosis & management of *Leishmania*/HIV co-infection. *The Indian journal of medical research*, 121(4), 407-414.
- Smith, C. C. T., & Yellon, D. M. (2011). Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(9), 1797-1806.
- Soares, D. C., Andrade, A. L. S., Delorenzi, J. C., Silva, J. R. A., Freire-de-Lima, L., Falcão, C. A. B., Pinto, A. C., Rossi-Bergmann, B., & Saraiva, E. M. (2010). Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology International*, 59(2), 173-177.
- Sporn, M. B., Liby, K. T., Yore, M. M., Fu, L., Lopchuk, J. M. & Gribble, G. W. (2011) New Synthetic Triterpenoids: Potent Agents for Prevention and Treatment of Tissue Injury Caused by Inflammatory and Oxidative Stress. *Journal of Natural Products*, 74(3), 537-545.
- Sundar, S., & Murray, H. W. (2005). Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(5), 394-395.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., & Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, 377(9764), 477-486.
- Takahashi, M., Fuchino, H., Sekita, S., & Satake, M. (2004). In vitro leishmanicidal activity of some scarce natural products. *Phytotherapy research*, 18(7), 573-578.

- Torres-Santos, E. C., Lopes, D., Oliveira, R. R., Carauta, J. P. P., Falcao, C. A. B., Kaplan, M. A. C., & Rossi-Bergmann, B. (2004). Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11(2-3), 114-120.
- Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56(3), 279-285.
- Vergara, J. A. P., Sánchez, J. M., & García, J. Á. G. (1998). Leishmaniasis e infección por el VIH. *La infección por el VIH: Guía práctica*. 2^a edição. 289-301. Andalucía: Sociedad Andaluza de Efermedades Infecciosas.
- Vermeersch, M., da Luz, R. I., Toté, K., Timmermans, J.-P., Cos, P., & Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3855-3859.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.
- Vermes, I., Haanen, C., & Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243(1-2), 167-190.
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series, (949), xii-xiii, 1-186.
- Zhao, L., Wientjes, M. G., & Au, J. L.-S. (2004). Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clinical Cancer Research*, 10(23), 7994-8004.

Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., Hassan, I. M. E., & Hassan, A. M. E. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(2), 87-98.

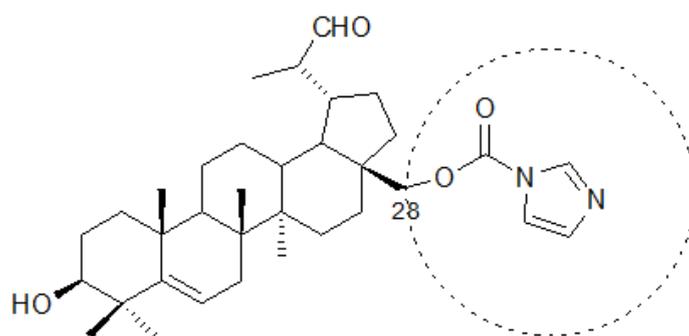
Zilberstein, D., & Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 48, 449-470.

Anexos

ANEXO I

Estrutura do derivado da betulina BT06

(1H-imidazol-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-(20R)-lupan-29-oxo-28-ilo



Estrutura do derivado do ácido betulínico AB13

(1H-imidazol-1-il)-carboxilato de 28-(1H-imidazol-1-il)-3,28-dioxo-lup-1,20(29)-dien-2-ilo

