



Micaela Filipa da Cruz Brás

Preparação de triterpenóides e avaliação da atividade antiparasitária em tripanossomatídeo *Leishmania infantum*

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e coorientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Micaela Filipa da Cruz Brás

Preparação de triterpenóides e avaliação da atividade antiparasitária em tripanossomatídeo *Leishmania infantum*

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e coorientada pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2015



Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra com vista à obtenção de grau
de Mestre em Química Farmacêutica Industrial

A investigação apresentada nesta dissertação foi realizada no laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação de Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa e coorientação de Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador.

O presente trabalho foi financiado pelo FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE) e pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do Projeto PEst-C/SAU/LA000172013-2014.



AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado, embora seja um trabalho individual e solitário inerente a qualquer investigador, só foi possível devido a um grupo de intervenientes que demonstraram muito empenho, aos quais presto aqui os meus solenes cumprimentos e agradecimentos:

À Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa, orientadora da dissertação, agradeço a transmissão de todos os conhecimentos científicos, o empenho, a permanente disponibilidade e simpatia com que me presenteou. Acima de tudo, obrigada por me continuar a acompanhar nesta jornada, pelo apoio e compreensão demonstrados e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, meu coorientador, pelo desafio de realizar a presente dissertação de mestrado, pela orientação dada, pelo esclarecimento de dúvidas e pela disponibilidade demonstrada.

A todos os membros no laboratório de Microbiologia e Parasitologia pela amizade demonstrada, disponibilidade e ajuda prestada. Em especial à Raquel Varandas pela transmissão do conhecimento científico e o incansável acompanhamento e disponibilidade na realização do trabalho laboratorial.

A todos os familiares e amigos, pela amizade e empenho, que caminhando a meu lado, acreditaram ser possível apesar de todas as adversidades.

Aos meus pais e irmã, pelo amor incondicional e carinho demonstrados. Em especial, agradeço toda a compreensão e presença nos momentos mais difíceis, com o apoio e palavras sábias.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“Existem muitas formas de agradecer, mas, a mais importante delas, reside na simplicidade de se encantar com a grandeza do gesto.”

Índice geral:

Resumo	i
Abstract	iii
Abreviaturas	v
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	ix

Capítulo I

1. <i>Leishmania</i> e leishmanioses	1
1.1. Nomenclatura e taxonomia	1
1.2. Morfologia	4
1.3. Vetores de infecção	5
1.4. Hospedeiros vertebrados	7
1.5. Ciclo de vida	10
1.6. Fisiopatologia	12
1.6.1. Leishmaniose Cutânea	13
1.6.2. Leishmaniose Mucocutânea	14
1.6.3. Leishmaniose Visceral	15
1.7. Epidemiologia	16
1.8. Tratamento	21
1.8.1. Fármacos aprovados	23
1.8.1.1. Antimoniais pentavalentes	23
1.8.1.2. Anfotericina	24
1.8.1.3. Pentamidina	25
1.8.1.4. Miltefosina	25
1.8.1.5. Paramomicina	26
1.8.1.6. Sitamaquina	26
1.8.2. Compostos naturais com atividade anti- <i>Leishmania</i>	27
1.8.2.1. Betulina e ácido betulínico	27
1.8.2.2. Derivados betulínicos com atividade anti- <i>Leishmania</i>	28

Capítulo II

2. Objetivos	33
--------------------	----

Capítulo III

3. Material e Métodos.....	35
3.1. Compostos	35
3.1.1. Identificação dos compostos utilizados	35
3.1.2. Descrição da síntese dos compostos	38
3.1.2.1. Procedimento geral para a obtenção dos derivados.....	40
3.1.2.1.1. Procedimento geral para a obtenção de derivados 2-metilimidazóis.....	41
3.1.2.1.2. Procedimento geral para a obtenção de derivados triazóis	41
3.2. Origem e cultura de <i>Leishmania</i>	42
3.3. Estudos de viabilidade celular	42
3.4. Estudo morfológico por microscopia ótica	43
3.5. Estudos do ciclo celular por citometria de fluxo.....	43

Capítulo IV

4. Resultados e discussão	46
4.1. Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos derivados da betulina.....	46
4.2. Determinação dos valores de CI_{50}	47
4.3. Relação estrutura atividade	50
4.3.1. Derivados da betulina.....	50
4.3.2. Derivados do ácido betulínico	53
4.4. Alterações morfológicas observadas em microscopia ótica	54
4.5. Efeitos no ciclo celular de promastigotas de <i>L. infantum</i>	58

Capítulo V

5. Conclusão	62
--------------------	----

Capítulo VI

6. Bibliografia.....	64
----------------------	----

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária endêmica em 98 países, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, onde afeta cerca de 12 milhões e coloca em risco mais de 350 milhões de pessoas. O agente etiológico é o tripanossomatídeo do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre através da picada do flebótomo. Durante o ciclo de vida os parasitas são digenéticos e expostos a diferentes ambientes: um extracelular dentro do hospedeiro invertebrado e um intracelular dentro do hospedeiro vertebrado. Consequentemente, como estratégia de sobrevivência, a *Leishmania* adota dois estádios morfológicamente distintos: o promastigota e o amastigota.

A virulência da *Leishmania* spp. que causa a infecção e a resposta originada pelo sistema imunitário do hospedeiro são fatores determinantes na manifestação clínica da parasitose: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. Segundo a OMS a leishmaniose visceral tem vindo a surgir como uma complicação associada a doenças que comprometem o sistema imunitário, como o VIH, alterando os padrões tradicionais epidemiológicos da transmissão de *Leishmania*. Os fármacos utilizados possuem limitações nomeadamente o preço, níveis de toxicidade, sucesso reduzido e devido à monoterapia estão associados ao desenvolvimento de resistência. É, portanto, necessário desenvolver terapias alternativas e caracterizar novos alvos terapêuticos para obter tratamentos mais eficientes, específicos e menos tóxicos.

Na literatura são encontrados alguns estudos que relatam a atividade anti-*Leishmania* de triterpenos derivados da betulina e do ácido betulínico. Idealmente, a modificação química destes produtos naturais pode melhorar significativamente a sua atividade e manter os níveis de toxicidade geralmente baixos, sendo por isso uma área de interesse crescente na descoberta de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*.

Com o objetivo de estudar a atividade leishmanicida dos derivados da betulina e do ácido betulínico, foram realizados ensaios de viabilidade celular em *Leishmania infantum*. Entre os 20 compostos testados, três compostos apresentaram elevada atividade anti-*Leishmania* ($CI_{50} < 100 \mu M$), seis atividade moderada ($100 < CI_{50} < 200 \mu M$) e onze não apresentaram atividade biológica significativa ($CI_{50} > 200 \mu M$),

A análise da estrutura/atividade dos derivados da betulina indicou que geralmente a carbamoilação das posições C3 e/ou C28 com a inserção do grupo 1,2,4-triazole nessas posições resulta num aumento da atividade leishmanicida, enquanto as mesmas modificações

realizadas com a adição do grupo 2-metilimidazole conduz à diminuição da atividade, demonstrando-se, assim, a importância do grupo triazole na atividade destes compostos. Os resultados obtidos sugerem que as modificações em C20 e C29 têm um impacto positivo na atividade anti-leishmanicida dos derivados da betulina e que a acetilação das posições C3 e/ou C28 diminui a atividade biológica dos derivados. Nos derivados do ácido betulínico a esterificação dos grupos hidroxilos em C3 e C28 na maioria dos casos reteve a atividade leishmanicida e a oxidação do grupo hidroxilo secundário em C3 aumentou a ação antiparasitária. Os compostos mais ativos, ou seja, que induziram a redução do número de promastigotas sob menor concentração, foram o derivado da betulina 24 (CI₅₀ de 48,68 µM) e o derivado do ácido betulínico 31 (CI₅₀ de 37,54 µM).

Foi também objetivo estudar os mecanismos de ação farmacológica dos compostos mais ativos de forma a elucidar possíveis alvos moleculares de atividade anti-*Leishmania*. Deste modo, estudaram-se os efeitos dos derivados 24 e 31 no ciclo celular e na morfologia do parasita. Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicam que os derivados betulínicos testados não alteram de forma significativa o ciclo celular. Deste modo, tudo indica que o mecanismo de ação principal dos derivados betulínicos testados não deverá estar relacionado com a inibição das topoisomerasas, enzimas descritas como potenciais alvos celulares. As alterações morfológicas induzidas pelo composto 31, nomeadamente células arredondadas, mais pequenas e com flagelos mais curtos, sugerem que o mecanismo de ação possa estar relacionado com alterações no citoesqueleto, na permeabilidade membranar e/ou na atividade mitocondrial.

Em conclusão, os resultados demonstraram a atividade leishmanicida dos derivados betulínicos e permitiram identificar os grupos funcionais mais importantes para a obtenção dessa atividade biológica. As modificações no grupo hidroxilo secundário da posição C3, na porção de alceno da posição C20 e no grupo hidroxilo primário da posição C28 conduziram à obtenção de diversos derivados betulínicos com atividades anti-*Leishmania* distintas. É de destacar que a adição de grupos triazóis aumenta o potencial dos derivados da betulina contra a *Leishmania*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic infectious disease endemic in 98 countries, predominantly in tropical and sub-tropical regions, where it affects about 12 million people, threatening more than 350 million. The causative agent is the trypanosomatid genus *Leishmania*, and its transmission occurs through the bite of the sand fly. During the life cycle, the parasites are digenetic and exposed to different environments: an extracellular within the invertebrate host, and an intracellular within the vertebrate host. Thus, as a survival strategy, the *Leishmania* adopts two morphologically distinct stages: the promastigote and amastigote.

The virulence of *Leishmania* spp. that causes the infection and response of the host's immune system are crucial in the clinical manifestation of disease: cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis. According to WHO visceral leishmaniasis has emerged as a complication associated with diseases that compromise the immune system such as HIV, changing the epidemiological traditional standards of *Leishmania* transmission. Existing drugs have limitations that are inclusive of price, toxicity levels and reduced success. As a result of monotherapy they are associated with resistance development, hence the necessity to develop alternative therapies and characterize new therapeutic targets for more efficient, specific and less toxic treatments.

Literature has found few studies reporting the anti-*Leishmania* activity of triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. Ideally, the chemical modification of these natural products can improve significantly its activity and maintain the generally low levels of toxicity. Therefore, this is an area of increasing interest for the discovery of novel compounds with anti-*Leishmania* activity.

With the aim of studying the leishmanicidal activity of derivatives of betulinic acid and betulin, the cell viability assays were performed in *Leishmania infantum*. Among the 20 compounds tested, three compounds were highly anti-*Leishmania* activity ($IC_{50} < 100 \mu M$), six moderate activity ($100 < IC_{50} < 200 \mu M$) and eleven showed no significant biological activity ($IC_{50} > 200 \mu M$).

The analysis of the structure/activity of betulin derivative indicated that generally carbamoylation on C3 and C28 positions coupled with the introduction of 1,2,4-triazole group at these positions, resulting in an improvement of leishmanicidal activity, while the same modifications made to the addition of 2-methylimidazole group leads to decreased activity. These results demonstrate the importance of the triazole group in the activity of these compounds. The results also suggest that modifications in C20 and C29 have a positive impact on the leishmanicidal activity of anti-derivatives of betulin and that acetylation of positions C3

and / or C28 decreases the biological activity of the derivatives. In betulinic acid derivatives esterification of the hydroxyl groups in C3 and C28, in most cases retained anti-leishmanial activity and the oxidation of the secondary hydroxyl group at C3 increased the anti-parasitic action. The most active compounds that induced reduction of promastigotes in low concentration, were the betulin derivative 24 ($IC_{50} = 48.68 \mu\text{M}$) and the derivative of betulinic acid 31 ($IC_{50} = 37.54 \mu\text{M}$).

The study of the pharmacological action mechanisms of the active compounds was also intended in order to elucidate possible molecular targets of anti-*Leishmania* activity. In this way, it is studied the effects of 24 and 31 derivatives in cell cycle and in the morphology of parasites. The results obtained by flow cytometry suggest that the tested derivatives betulínicos not significantly alter the cell cycle. Thus, it appears that the main mechanism of action of the tested betulínicos derivatives should not be related to the inhibition of topoisomerases, enzymes described as potential cellular targets. The morphological changes induced by compound 31, in particular round cell smaller and shorter flagella, suggest that the mechanism of action could be related cytoskeleton alterations in membrane permeability and/or mitochondrial activity.

In conclusion, the results demonstrated the activity of leishmanicidal betulínicos derivatives and helped to identify the most important functional groups to obtain this biological activity. Changes in secondary hydroxyl group of the C3 position, the alkene portion of the C20 position and the primary hydroxyl group in C28 position prompt to obtain various betulinic derivatives with distinct anti-*Leishmania* activity. It is noted that the addition of triazole groups increase the potential of betulinic derivatives against *Leishmania*.

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADP:** Difosfato de adenosina
- AmB:** Anfotericina B
- ATP:** Trifosfato de adenosina
- br:** *Broad*
- C:** Carbono
- CBMI:** 1,1'-Carbonilbis(2-metilimidazole)
- CDI:** 1,1'-carbonildiimidazole
- CDT:** 1,1'-carbonil-di(1,2,4-triazole)
- CI₅₀:** Concentração inibitória a 50%
- COSY:** *Correlated spectroscopy*
- d:** Duplete
- dd:** Duplo duplete
- DEPT:** *Distortionless enhancement by polarization transfer*
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- dt:** Duplo tripleto
- EI-MS:** Impato electrónico - espectrometria de massa
- FCC:** *Flash Column chromatography*
- GM/MS:** Cromatografia gasosa/espectrometria de massa
- HePC:** Hexadecilfosfocolina
- HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanosulfónico
- HMBC:** *Heteronuclear multiple bond correlation*
- HMQC:** *Heteronuclear single quantum correlation*
- HSV I:** Vírus herpes simples tipo I
- IC:** Intervalo de confiança a 95%
- IP:** Iodeto de propídio
- IUPAC:** União Internacional de Química Pura e Aplicada
- IV:** Espectroscopia de infravermelho
- J:** Constante de acoplamento
- kADN:** Ácido desoxirribonucleico cinetoplastida
- LCan:** Leishmaniose canina
- LDPK:** Leishmaniose dérmica pós-kala azar
- LPG:** Lipofosfoglicano

m/z: Razão massa/carga
m: Multiplete
mARN: Ácido ribonucleico mensageiro
MLEE: Eletroforese multi-*locus* de enzimas
MON: *Monpellier*
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
ONLeish: Observatório Nacional das Leishmanioses
P.f.: Ponto de fusão
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PCR: Reação em cadeia da polimerase
RMN ¹³C: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
RMN: Ressonância magnética nuclear
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
s: Singleto
SBF: Soro bovino fetal
Sb^{III}: Antimonial trivalente
Sb^V: Antimoniais pentavalentes
THF: Tetra-hidrofurano
TLC: Cromatografia em camada fina
TPP: Perfis de produtos-alvo
VIH: Vírus da imunodeficiência humana
δ: Desvio químico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonómica das espécies de <i>Leishmania</i>	2
Figura 2 - Representação esquemática do desenvolvimento do parasita no intestino do vetor	3
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura das formas promastigotas e amastigota de <i>Leishmania</i>	5
Figura 4 - Distribuição das espécies de flebotomos <i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> nos países europeus até ao ano 2009	7
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> e modo de transmissão antroponótico e zoonótico .	8
Figura 6 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> no interior do mamífero hospedeiro	11
Figura 7 - Ciclo biológico dos subgéneros <i>Leishmania</i> num vetor competente	12
Figura 8 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral.....	17
Figura 9 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea	17
Figura 10 - Distribuição mundial da leishmaniose e países que identificaram coinfeção <i>Leishmania</i> /VIH até 2001	19
Figura 11 - Distribuição das espécies <i>L. infantum</i> e <i>L. tropica</i> nos países europeus até ao ano 2009.....	20
Figura 12 - Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal	21
Figura 13 - Estrutura química da betulina e do ácido betulínico	28
Figura 14 - Estrutura química dos derivados da betulina e da di-hidrobetulina com atividade leishmanicida	29
Figura 15 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida.....	30
Figura 16 - Estrutura química do derivado betulínico com adição de heterocíclico na cadeia lupano com atividade leishmanicida.....	30
Figura 17 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida.....	31
Figura 18 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida.....	31
Figura 19 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida.....	31
Figura 20 - Estrutura química dos reagentes 1,1'-carbonildiimidazole (CDI), 1,1'-carbonilbis(2'-metilimidazole) (CBMI), e 1,1'-carbonil-di(1,2,4-triazole) (CDT).....	39
Figura 21 - Mecanismo reacional dos terpenóides CDI e formação de carbamatos, N-alquilimidazóis e imidazóis.	39
Figura 22 - Representação da síntese dos derivados 11-14 da betulina	40

Figura 23 - Efeito dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	46
Figura 24 - Efeito dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	47
Figura 25 - Estrutura química do derivado da betulina 20 e identificação de grupos funcionais	51
Figura 26 - Estrutura química do derivado da betulina 24 e identificação de grupos funcionais	51
Figura 27 - Estrutura química do derivado da betulina 17 e identificação de grupos funcionais	52
Figura 28 - Estrutura química do derivado da betulina 25 e identificação de grupos funcionais	53
Figura 29 - Estrutura química do derivado da betulina 29 e identificação de grupos funcionais	54
Figura 30 - Estrutura química do derivado da betulina 31 e identificação de grupos funcionais.	54
Figura 31 - Observação por microscopia ótica em contraste de fase dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> na ausência e presença dos derivados 24 e 31, após incubação a 26°C durante 6 horas	55
Figura 32 - Observação por microscopia ótica em contraste de fase dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> na ausência e presença dos derivados 24 e 31, após incubação a 26°C durante 24 horas	56
Figura 33 - Histogramas representativos do conteúdo de ADN dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> expostas aos derivados da betulina (24) e do ácido betulínico (31)	59

ÍNDICE DE TABELA

Tabela I - Relação entre as espécies de <i>Leishmania</i> e as respectivas manifestações clínicas no homem, reservatórios e distribuição geográfica	9
Tabela II - Derivados da betulina e respetiva estrutura química.....	35
Tabela III - Derivados do ácido betulínico e respetiva estrutura química.....	37
Tabela IV - Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	48
Tabela V - Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	49
Tabela VI - Agrupamento dos derivados da betulina e do ácido betulínico segundo as concentrações inibitórias a 50 % (CI ₅₀) em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	49
Tabela VII - Efeitos dos derivados 24 e 31, nas concentrações CI ₅₀ , no ciclo celular de <i>Leishmania infantum</i>	59

CAPÍTULO I

1. LEISHMANIA E LEISHMANIOSES

Parasitismo é definido como uma relação não simbiótica entre espécies, onde o parasita beneficia em detrimento do hospedeiro^[1]. Os cinetoplastídeos tripassomatídeos são um grupo de parasitas protozoários flagelados transmitidos por vetores ao homem^[2]. As doenças humanas mais comuns causadas por este grupo de parasitas são a tripanossomíase humana africana, a doença de Chagas e as leishmanioses. Em conjunto, estas doenças causam mais de 100 000 mortes anuais e são consideradas como negligenciadas, uma vez que o tamanho da população infetada é excessivamente alto quando comparado com o nível de investimento em pesquisas de tratamentos^[3].

A Organização Mundial de Saúde considera a leishmaniose endêmica em 98 países afetando cerca de 12 milhões de pessoas e uma população em risco de mais de 350 milhões^[4]. As leishmanioses são provocadas por mais de 20 espécies de parasitas protozoários da espécie *Leishmania* e são transmitidas ao homem por aproximadamente 30 espécies de flebótomos^[5]. A manifestação clínica da parasitose depende da virulência da espécie de *Leishmania* que causa a infecção, bem como da resposta imunitária do hospedeiro. Dependendo da manifestação clínica a leishmaniose pode ser classificada como: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea^[6, 7]. Os fármacos atualmente existentes possuem limitações, e devido à monoterapia estão associados ao desenvolvimento de resistência^[8].

1.1. NOMENCLATURA E TAXONOMIA

No início do século XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna elaboraram estudos independentes onde identificaram os parasitas que causam as leishmanioses^[4]. Ronald Ross, em 1903, denominou os parasitas pelo nome genérico *Leishmania*^[9]. Nicolle, em 1908, nomeou o parasita que causava anemia em crianças de *Leishmania infantum*^[4, 10].

Os parasitas do género *Leishmania* possuem características estruturais bastante similares, o que impede a identificação das espécies através da morfologia celular^[11]. Assim, a classificação de *Leishmania* foi inicialmente baseada em critérios extrínsecos como a distribuição geográfica e características clínicas^[12]. Com o passar dos anos, foram realizadas pesquisas em reservatórios e vetores, estudos de ecologia e dos ciclos biológicos da leishmaniose. Estes estudos fortaleceram a base para a classificação e a compreensão da transmissão da doença

para os seres humanos^[4]. A partir de 1970, critérios intrínsecos como dados imunológicos e bioquímicos foram utilizados para definir as espécies de *Leishmania*. Na década de oitenta começou a ser utilizado um sistema de classificação com base no estudo de isoenzimas. Esta abordagem consiste num método de classificação numérica cladístico que utiliza isoenzimas como marcadores evolutivos (técnica MLEE). Desde os anos noventa, surgiram várias técnicas baseadas no estudo do ácido desoxirribonucleico (ADN), utilizadas como complemento para estudos fenéticos e filogenéticos^[13]. Em 1990 a Organização Mundial de Saúde publicou um esquema taxonómico (Figura 1) resultante da utilização de fatores extrínsecos, imunológicos, bioquímicos e moleculares para a identificação e classificação das espécies *Leishmania*^[14, 15].

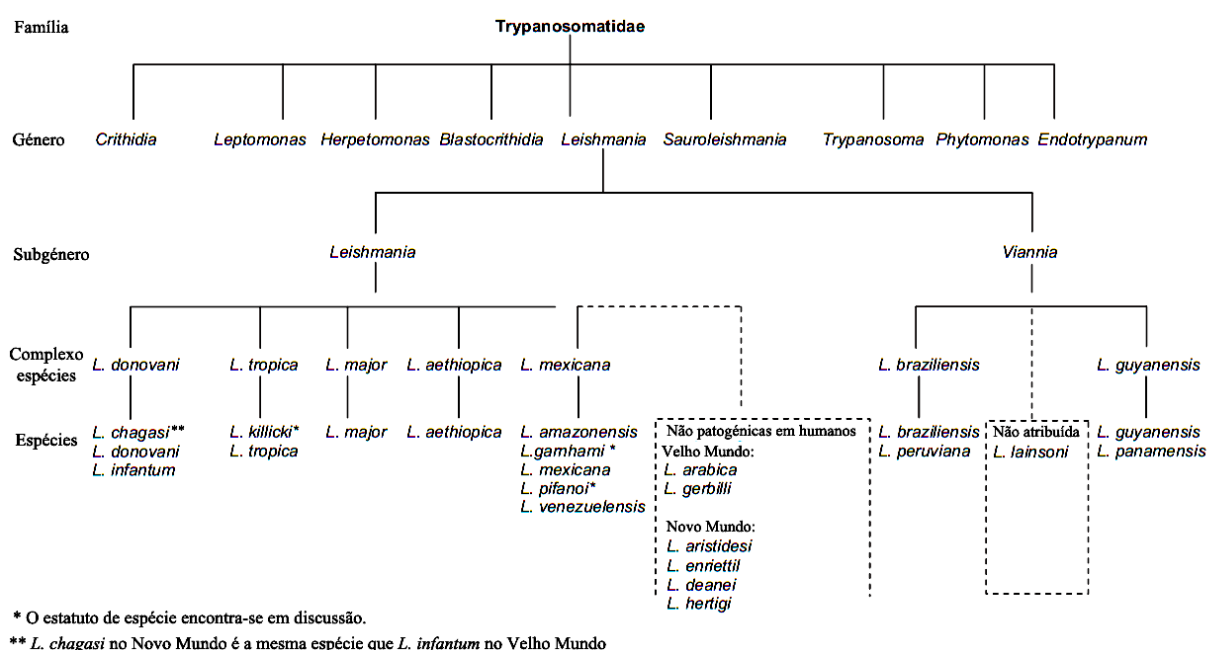


Figura 1- Classificação taxonómica das espécies de *Leishmania*^[4].

A classificação taxonómica mais recente dos protozoários do género *Leishmania* classifica-a como pertencente à Família Trypanosomatidae, ordem Trypanosomatida, classe Kinetoplastia do filo Euglenozoa^[16, 17].

O género *Leishmania* é dividido nos subgéneros *Leishmania* e *Viannia*, como foi proposto por Lainson e Shaw em 1987^[12, 14]. Esta subdivisão deve-se às diferenças no desenvolvimento dos parasitas no inseto vetor. No subgénero *Leishmania*, o desenvolvimento dos promastigotas é restrito a determinadas partes do trato digestivo, nomeadamente no intestino médio e anterior (desenvolvimento *suprpylaria*). Nas espécies do subgénero *Viannia*, uma das fases de desenvolvimento ocorre no intestino posterior (desenvolvimento *peripylaria*) (Figura 2)^[18, 19].

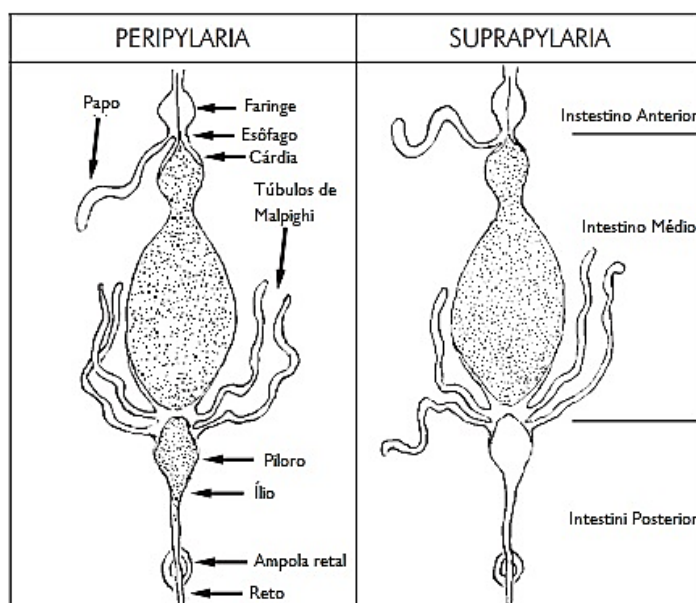


Figura 2 - Representação esquemática do desenvolvimento do parasita no intestino do vetor ^[19].

Como representado na Figura 1, os subgêneros *Leishmania* e a *Viannia* estão divididos em diversos complexos de espécies. O subgênero *Leishmania* engloba: o complexo *L. donovani* que compreende as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (sinônimo da *L. infantum* mas encontra-se no “Novo Mundo”, isto é nas Américas)^[20, 21]; o complexo *L. tropica* engloba *L. tropica* e *L. killicki* (alguns autores descrevem como espécies similares não havendo consenso); os complexos *L. major* e *L. aethiopica* dos quais fazem exclusivamente parte as respectivas espécies; o complexo *L. mexicana* que inclui *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis* (a taxonomia das espécies *L. gamhami* e *L. pifanoi* ainda se encontra em discussão); por último o complexo de espécies não patogênicas no homem, onde as espécies *L. gerbilli* e *L. arábica* estão presentes no “Velho Mundo” (África, Ásia, Europa)^[22]. O subgênero *Viannia* abrange as espécies *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*.

As técnicas comumente utilizadas para caracterizar e diferenciar espécies de *Leishmania* são a eletroforese multi-locus de enzimas (MLEE) e vários métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR): tipagem por sequenciação de Multi-locus (MLST), PCR-polimorfismo de restrição no comprimento de fragmento (PCR-RFLP), multiplex PCR e PCR seguida por sequenciação^[13, 23]. Estes métodos geralmente usam genes microsatélites como alvos de amplificação: ADN cinetoplastida (kADN), sequências teloméricas, proteínas de choque térmico, como HSP70 e HSP60, entre outros^[23].

A Eletroforese Multi-locus de enzimas (MLEE) tem sido considerada a técnica padrão para identificação de espécies de *Leishmania* durante os últimos 25 anos^[24]. Este método permite

agrupar as estirpes com perfis evolutivos semelhantes, em unidades designadas por zimodemos^[25, 26]. Em 1981 Lanotte e colaboradores identificaram apenas 2 zimodemos de *L. infantum*. Posteriormente, à medida que aumentou o número de estirpes descritas, houve um acréscimo no número de zimodemos. No estudo de Pratlong e colaboradores foram identificados 37 zimodemos de *L. infantum*: o MON-I é o predominante no Sul da Europa e da África e no Próximo e Médio Oriente; o MON-24 apresenta uma distribuição geográfica confinada à Bacia do Mediterrâneo^[10]. Em Portugal verificou-se a predominância do zimodemo MON-I nas infeções no homem, animais (cães, raposas, gatos, ratos) e nos vetores flebótomos^[10, 27].

1.2. MORFOLOGIA

Durante o ciclo de vida os parasitas *Leishmania* são digenéticos e expostos a diferentes ambientes: extracelular no hospedeiro invertebrado e intracelular no hospedeiro vertebrado^[12]. A estratégia de sobrevivência do parasita a essas mudanças ambientais é evoluir para formas altamente especializadas e adaptadas a cada ambiente^[28]. Deste modo, *Leishmania* adota dois estádios morfologicamente distintos: o promastigota e o amastigota, encontrados respetivamente em organismos invertebrados e vertebrados^[29]. Os promastigotas (Figura 3A) são organismos alongados, com um comprimento de 15 a 30 μm e com uma largura de 2 a 3 μm e são encontrados no tubo digestivo do inseto vetor. Os promastigotas apresentam organelos e estruturas típicas dos organismos eucariotas, tais como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e citoesqueleto. Esta forma apresenta também alguns organelos característicos da Família Trypanosomatidae como o cinetoplasto com ADN mitocondrial (kADN), a estrutura flagelar, acidocalcissomas e glicossomas. Os promastigotas são caracterizados pela presença de um flagelo longo e funcional que emerge na parte anterior do corpo. O flagelo tem duas funções principais: conferir mobilidade ao parasita e ajudá-lo a se fixar no epitélio intestinal do inseto vetor^[30, 31].

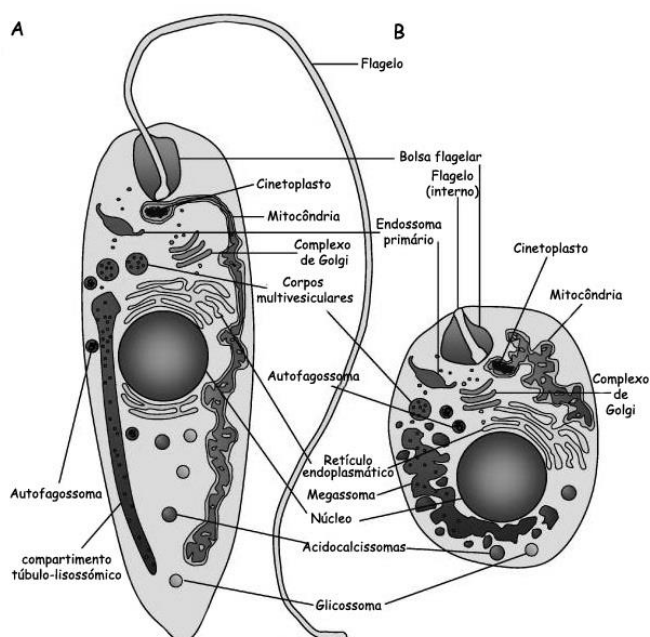


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura das formas promastigotas (A) e amastigota (B) de *Leishmania*^[28].

Os amastigotas (Figura 3B) são células ovóides de 2 a 6 μm de diâmetro, encontrados no fagolisossoma das células do sistema fagocitário do hospedeiro vertebrado^[32]. Os componentes estruturais são análogos aos da forma promastigota, com a exceção do megassoma que é exclusivo da forma amastigota. O flagelo da forma amastigota é intracelular e não funcional^[28, 30].

Ambas as formas apresentam componentes das vias de exocitose e lisossomal, apesar de existirem diferenças na quantidade, volume e localização celular dos organelos^[28, 30]. Em síntese, as maiores diferenças entre os dois estados residem na forma e no tamanho dos componentes e não na sua composição celular^[28].

1.3. VETORES DE INFECÇÃO

Os vetores de infecção são insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. São comumente chamados de flebótomos e popularmente conhecidos por mosquito palha^[12]. Os flebótomos apresentam uma morfologia bastante similar, no entanto com uma cor variada de cinza-prata a quase preto^[33]. Diferem dos mosquitos por deterem um voo silencioso, serem peludos e com pequenas dimensões (normalmente 2-3 mm de comprimento)^[34, 35].

Atualmente estão identificadas cerca de 800 espécies de flebotomos que foram agrupadas em cinco gêneros principais: no “Velho Mundo” *Phlebotomus* (94 espécies) e *Sergentomyia* (258 espécies); no “Novo Mundo” *Lutzomyia* (379 espécies), *Brumptomyia* (23 espécies) e *Warileya* (5 espécies)^[33]. Dos gêneros descritos, apenas dois transmitem a leishmaniose: *Phlebotomus* no “Velho Mundo” e *Lutzomyia* no “Novo Mundo”^[4], sendo que destes apenas 31 espécies foram identificadas positivamente como vetores dos parasitas *Leishmania* e 43 como vetores prováveis^[4,36]. Foi detetado que na natureza as espécies de flebotomos apresentam especificidade para a transmissão de espécies de *Leishmania*^[32, 37], estando esta especificidade relacionada com a capacidade de infecção, sobrevivência e multiplicação da espécie parasitária no hospedeiro invertebrado^[38]. Em estudos laboratoriais algumas espécies de flebotomos apresentaram especificidade para a espécie de *Leishmania* infetante na natureza (por exemplo, *Phlebotomus papatasi* para *Leishmania major*), sendo consideradas restritivas (ou específicas). No entanto, verificou-se que outras espécies de vetores são capazes de acolher infecções laboratoriais de várias espécies de *Leishmania* (por exemplo, *Lutzomyia longipalpis* tanto com *Leishmania chagasi* como com *Leishmania mexicana*) sendo denominadas de permissivas (ou não específicas)^[4, 38].

A diversidade de vetores permite uma ampla distribuição epidemiológica da doença^[39], ocorrendo infecções provocadas pelo inseto vetor em todas as regiões intertropicais da América e África e em regiões temperadas da América do Sul e Europa e Ásia^[31, 40]. As diferentes espécies de flebotomos ostentam *habitats* distintos^[4]. No caso da leishmaniose visceral, a incidência do vetor *Phlebotomus argentipes* nas regiões subtropicais no subcontinente indiano ocorre predominantemente em aldeias rurais próximas da planície de inundação. Em contraste, os vetores *Phlebotomus orientalis* e outras espécies de *Phlebotomus* são responsáveis pela transmissão em duas regiões bioclimáticas distintas da África Oriental: em savanas e perto de vilas rurais^[39]. Na Europa ocidental as espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (Figura 4) foram identificadas como as espécies vetoras de *L. infantum*^[41]. Os vetores de transmissão no “Novo Mundo” são as espécies *Lutzomyia*, abundantes em ambientes peri-domiciliares e em muitas das regiões tropicais mais secas da América Latina^[39]. No entanto, é de referir que os vetores têm sofrido adaptações às mudanças ambientais (desflorestação, urbanização, entre outros) levando a uma redefinição dos limites geográficos^[42, 43]. Um exemplo dessa adaptação é o caso dos vetores de *L. braziliensis* onde apesar de preferirem viver em ambientes florestais^[40,44], atualmente verifica-se a sua participação na transmissão do parasita em áreas rurais e suburbanas^[43, 45].

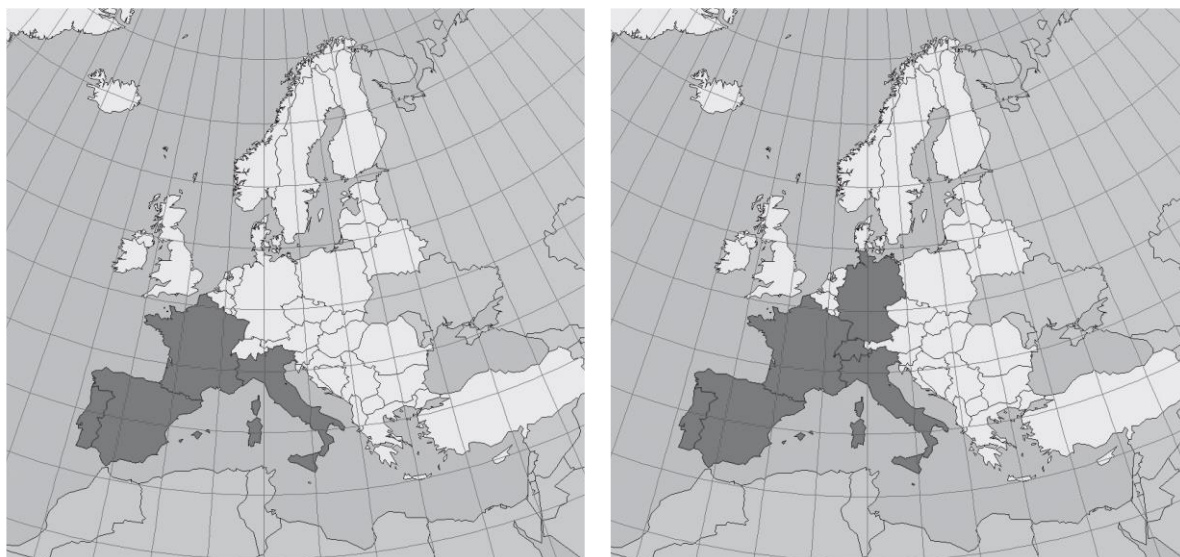


Figura 4 - Distribuição das espécies de flebotomos (a) *Phlebotomus ariasi*, (b) *P. perniciosus* nos países europeus até ao ano 2009. (■) espécie ausente; (■) espécie presente; (□) espécie esporádica^[52].

A atividade máxima deste mosquito verifica-se entre o anoitecer e o amanhecer, permanecendo na maior parte do dia nos seus abrigos^[46]. Ambos os géneros dos flebotomos alimentam-se de carboidratos que ingerem das plantas, no entanto, as fêmeas necessitam das proteínas sanguíneas para o desenvolvimento dos ovos. Por isso, apenas a fêmea hematófaga transmite o parasita aos hospedeiros vertebrados^[4]. Os locais de repouso e de oviposição são zonas ricas em matéria orgânica^[47].

1.4. HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Ao longo do século passado, demonstrou-se que diversas espécies de mamíferos selvagens são suscetíveis a infeções com *Leishmania*^[48]. As espécies suscetíveis à infeção com *Leishmania* são denominadas de hospedeiras^[4]. Os hospedeiros mamíferos responsáveis pela subsistência, ao longo do tempo, da população do parasita são denominados de hospedeiros reservatórios^[49]. Para tal, a espécie do mamífero deve ser abundante e viver o tempo suficiente, de modo a proporcionar uma fonte de alimento ao vetor. Outra característica importante é a disponibilidade do parasita na pele ou no sangue do mamífero em número suficiente, favorecendo, assim, a conseqüente transmissão ao inseto vetor e a manutenção do parasita na natureza^[4,48]. É ainda importante que após a infeção, os hospedeiros não apresentem sintomas de infeção durante um longo período de tempo, apesar de alguns estudos serem controversos^[48]. De acordo com o tipo de hospedeiros vertebrados, as leishmanioses podem ser agrupada em duas grandes categorias: leishmanioses zoonóticas, em

que os reservatórios são animais selvagens e animais domésticos; e as leishmanioses antroponóticas, em que o homem é a única fonte de infecção do vetor (Figura 5)^[22]. Normalmente, cada espécie de *Leishmania* tem um ciclo zoonótico ou antroponótico, todavia verificam-se que em algumas leishmanioses tipicamente zoonóticas, os seres humanos podem constituir uma fonte ocasional de infecção^[4]. *L. infantum* que apresenta um ciclo de vida zoonótico peridoméstico (o reservatório é um animal peridoméstico ou doméstico) pode ser transmitida para seres humanos^[12].

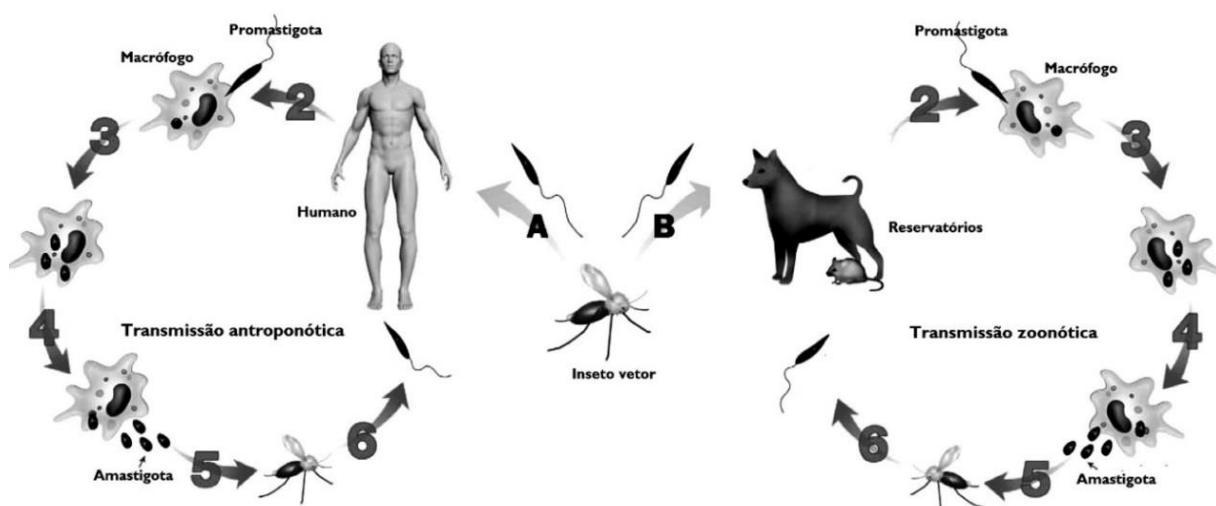


Figura 5 - Ciclo de vida de *Leishmania* e modo de transmissão antroponótico (A) e zoonótico (B). A forma promastigota de *Leishmania* é injetada na pele durante a refeição sanguínea do inseto vetor (1), seguidamente, ocorre a incorporação do promastigota por macrófagos do hospedeiro (2). Promastigotas são convertidos na forma não-flagelada, amastigota dentro dos macrófagos (3) e ocorre a multiplicação da forma amastigota por fissão binária (4). Os amastigotas são libertados devido à rutura dos macrófagos (5) e pode, então, ser ingerida por um flebótomo durante uma outra refeição de sangue. A forma amastigota é convertida à forma promastigota no intestino médio do vetor e, em seguida, pode voltar a ser transmitido ao homem (transmissão antroponótica) ou a outro animal, que atua como reservatório (transmissão zoonótica)^[51].

A transmissão de parasitas *Leishmania* antroponótica ocorre essencialmente no subcontinente indiano e na Ásia, enquanto que na África, Europa e nas Américas ocorre principalmente leishmanioses zoonóticas (Tabela I)^[50, 51]. Na Europa apesar da predominância do ciclo zoonótico visceral e cutâneo causado por *L. infantum* em toda a região mediterrânica, verifica-se também um ciclo antroponótico cutâneo causado por *L. tropica* que surge esporadicamente na Grécia^[52].

Tabela I - Relação entre as espécies de *Leishmania* e as respectivas manifestações clínicas no homem, reservatórios e distribuição geográfica ^[18, 22].

Espécies de <i>Leishmania</i>	Doença no Homem	Distribuição geográfica	Reservatório principal
<i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>)	Leishmaniose visceral; Leishmaniose cutânea local	Europa, Norte Africano, América Central e do Sul, Sudoeste da Ásia	Cães domésticos e selvagens (zoonótico)
<i>L. donavani</i>	Leishmaniose visceral	Subcontinente indiano, África Oriental	Homem (antroponótico)
<i>L. major</i>	Leishmaniose cutânea local	Norte da África, Ásia Central, Médio Oriente, África Oriental	Vários roedores da família Gerbillidae (zoonótico)
<i>L. tropica</i>	Leishmaniose cutânea local	Centro e Oeste da Ásia	Homem (antroponótico)
<i>L. aethiopica</i>	Leishmanioses cutâneas: local e difusa	Etiópia, Quênia	Damão-do-cabo (<i>Heterohyrax brucei</i> e espécies <i>Procavia</i>) (zoonótico)
<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea local	América Central	Vários roedores silvestres (<i>Ototylomys phyllotis</i> entre outras) (zoonótico)
<i>L. amazonensis</i>	Leishmanioses cutâneas: local e difusa	América do Sul, norte do Amazonas	Roedores silvestres (Espécies <i>Proechimys</i> entre outras) (zoonótico)
<i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniose cutânea local	Venezuela	Desconhecido
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea local; Leishmaniose mucocutânea	América do Sul, América Central e no México	Roedores silvestres (espécies <i>Akodon</i> e <i>Proechimys</i> entre outras) (zoonótico)
<i>L. guyanensis</i>	Leishmaniose cutânea local	América do Sul	Preguiças (<i>Choloepus didactylus</i>) (zoonótico)
<i>L. lainsoni</i>	Leishmaniose cutânea local	Brasil, Bolívia, Peru	Roedores (zoonótico)
<i>L. naiffi</i>	Leishmaniose cutânea local	Brasil, Guiana Francesa, Equador, Peru	Tatus (zoonótico)
<i>L. panamensis</i>	Leishmaniose cutânea local; Leishmaniose mucocutânea	América Central, Colômbia, Equador	Preguiças (<i>Choloepus hoffmanni</i>) (zoonótico)
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniose cutânea local	Peru	Cão (zoonótico)
<i>L. shawi</i>	Leishmaniose cutânea local	Brasil	Suspeita sobre mamíferos arborícolas

Os reservatórios principais de espécies de *Leishmania* são mamíferos silvestres como roedores silvestres e canídeos silvestres e domesticados ^[31]. A transmissão de *L. infantum* em cães domésticos pela picada de flebotomos infetados foi demonstrada pela primeira vez na década de 1930 ^[52]. O cão doméstico é o principal hospedeiro reservatório desta espécie de *Leishmania*, sendo o homem considerado hospedeiro acidental, não contribuindo para a

transmissão do parasita^[53]. O fato do homem não ser considerado um bom reservatório de *L. infantum* é explicado devido ao curto período de vida do parasita no organismo aquando de uma infecção. Nos casos em que persiste durante alguns anos, os parasitas não se encontram disponíveis na circulação^[49]. É também importante realçar que a suscetibilidade do homem à *L. infantum* é reduzida e, conseqüentemente, a doença clínica está associada com a idade (crianças com menos de dois anos são as mais afetadas), desnutrição e imunossupressão (por exemplo, a coinfeção VIH)^[32].

1.5. CICLO DE VIDA

O início do ciclo de infecção ocorre quando as fêmeas flebótomos infetadas realizam a sua refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado (Figura 6). Durante esta refeição, o vetor inocula a forma promastigota metacíclica na epiderme do hospedeiro. A picada do flebótomo induz uma rápida resposta do sistema imunitário, levando à afluência de fagócitos (neutrófilos, células dendríticas e macrófagos) para a zona infetada^[54]. Posteriormente, o promastigota é fagocitado por células do sistema fagocitário mononuclear presentes na epiderme do hospedeiro, através da incorporação pelo fagossoma (um vacúolo formado a partir da membrana da célula hospedeira)^[2,55]. Seguidamente, ocorre a diferenciação da forma promastigota na forma amastigota nos fagossomas de macrófagos e de outras células mononucleares^[56] e após esta diferenciação verifica-se a fusão do fagossoma com o lisossoma formando-se o fagolisossoma. Esta diferenciação é essencial à maioria das espécies de *Leishmania*, uma vez que permite que o parasita sobreviva às condições ambientais (ambiente ácido e proteolítico) dos fagolisossomas^[55, 57]. Embora formas promastigotas do parasita sejam fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas e macrófagos e se diferenciarem em amastigotas nestes tipos de células, a replicação do parasita apenas ocorre dentro dos macrófagos^[54].

A forma amastigota adaptada ao ambiente reproduz-se por divisão binária, levando ao rompimento das membranas dos macrófagos e conseqüentemente, à libertação dos amastigotas^[32, 56]. Os parasitas começam a difundir-se através dos sistemas linfático e vascular e a infetar outros macrófagos^[5]. Nesta fase crónica, as manifestações clínicas são distintas e dependentes tanto das espécies de *Leishmania*, como do estado do sistema imunológico do hospedeiro^[40,58]. O tipo de leishmaniose desenvolvido depende assim do tipo de disseminação dos amastigotas. Estes podem localizar a infecção apenas nos macrófagos da pele, dando origem à leishmaniose cutânea, podem disseminar para a mucosa originando a leishmaniose

mucocutânea ou disseminar-se para outros órgãos ricos em macrófagos (baço, linfonodos, fígado e medula óssea), como na leishmaniose visceral)^[5, 40].

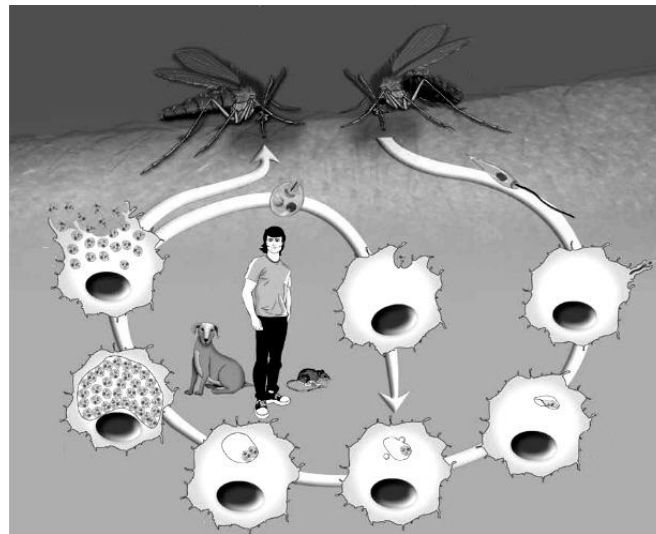


Figura 6 - Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do mamífero hospedeiro.

A infecção do flebótomo é iniciada quando as fêmeas hematófagas realizam uma refeição sanguínea em hospedeiros vertebrados infetados (Figura 7). Juntamente com o sangue, o flebótomo ingere células, especialmente macrófagos, contendo formas amastigotas da *Leishmania*. Normalmente, os parasitas ingeridos pelo vetor estão presentes na própria pele e não no sangue periférico^[32, 40].

Esta refeição infetada é transferida para o intestino médio abdominal, onde ocorre a rutura dos macrófagos e consequente libertação das formas amastigotas^[58]. A alteração das condições do ambiente, do hospedeiro vertebrado para o intestino médio do vetor (diminuição da temperatura e aumento do pH), induz a rápida transformação do parasita em formas promastigotas procíclicas. Esta forma é pouco móvel e multiplica-se na matriz peritrófica^[32, 59]. Depois de 48 a 72 horas, os parasitas começam a abandonar a sua replicação e diferenciam-se em promastigotas nectomonadais (longos e de forte motilidade). Estes evadem-se da matriz peritrófica, que se começa a desintegrar, e migram para partes do intestino do inseto distintas consoante o subgénero de *Leishmania*^[59, 60]. Assim, no caso do subgénero *Viannia* os nectomonadais migram para o intestino posterior (principalmente para o piloro) e no subgénero *Leishmania* para a parte anterior do intestino médio^[32, 61]. Durante a migração, alguns nectomonadais aderem ao epitélio do intestino. A adesão é estabelecida através de uma ligação entre o lipofosfoglicano (LPG) do flagelo do parasita e a galectina do epitélio do intestino do flebótomo^[32]. Ao ancorar-se no intestino médio, os parasitas impedem a sua

expulsão durante a defecação, e tem sido postulado que essa ligação é o principal determinante da especificidade do parasita-vetor^[59, 62]. Quando os nectomonadais chegam à válvula estomodeu (junção entre o intestino médio e intestino anterior) transformam-se em promastigotas leptomonadais (um sinônimo para nectomonadais curtos) que iniciam um novo ciclo proliferativo^[32]. Em todas as espécies de *Leishmania*, a fase final de desenvolvimento resulta na colonização da válvula de estomodeu, uma estrutura que regula a ingestão de sangue durante a alimentação. É neste local que os parasitas se concentram e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclologênese^[59]. Durante a metaciclologênese os promastigotas apresentam redução no tamanho do corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infecciosos passando a ser denominados promastigotas metacíclicas^[63]. Ao danificar a válvula estomodeal, as formas metacíclicas migram para a probóscide e são regurgitados e transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo^[63, 64].

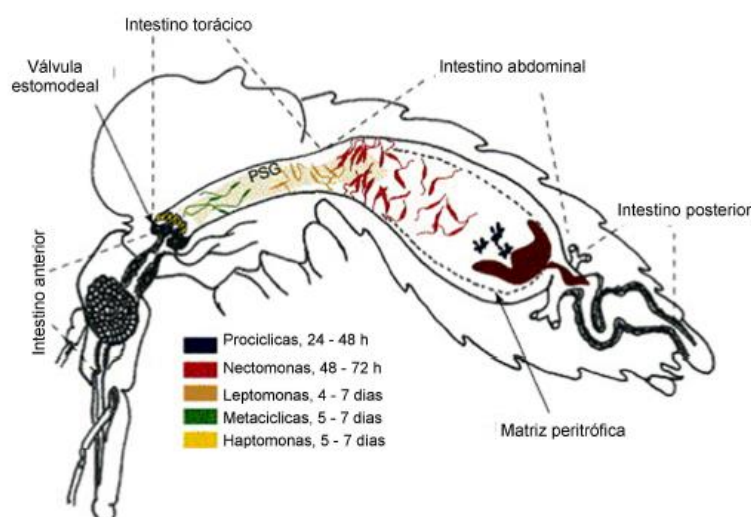


Figura 7 - Ciclo biológico dos subgêneros *Leishmania* num vetor competente, ilustrando o desenvolvimento sequencial e morfológico das diferentes formas de promastigotas ao longo do trato digestivo do flebótomo^[60].

1.6. FISIOPATOLOGIA

A leishmaniose humana tem como alvo as células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos e órgãos ricos nos mesmos, tais como fígado, baço, medula óssea, pele e linfonodos^[65]. Dependendo das interações entre as características de virulência das espécies infetantes de *Leishmania* e as respostas imunitárias do hospedeiro, verifica-se um espectro de doenças clínicas^[40,66]. Os macrófagos infetados podem permanecer localizados na pele (Leishmaniose cutânea), disseminar-se para a mucosa (Leishmaniose mucocutânea) ou para outros órgãos como linfóides secundários (baço e linfonodos), fígado e medula óssea

(Leishmaniose visceral). Além disso, dependendo da competência do sistema imunitário do hospedeiro este paradigma é alterado^[40, 67].

1.6.1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A leishmaniose cutânea é a forma menos grave da doença. Diferentes espécies de *Leishmania* podem infectar os macrófagos da derme, com apresentações clínicas e prognósticos variáveis^[5]. No “Velho Mundo”, a patologia é causada por cinco espécies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani*, sendo as infecções por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* as mais comuns. No “Novo Mundo”, a leishmaniose cutânea é causada por espécies tanto do subgênero *Leishmania* como *Viana*, destacando *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania braziliensis*^[4, 66].

O primeiro sinal de infecção é um pequeno eritema causado pela picada do inseto, que gradualmente aumenta, permanecendo vermelho mas sem calor ou dor perceptível. Em seguida, devido à migração dos leucócitos para a área afetada, ocorre a necrose dos tecidos infectados e há formação de um granuloma cicatrizante na base da lesão. O processo de necrose pode ser rápido, causando uma ferida larga, aberta e húmida, especialmente nas infecções com *L. major*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*, ou pode ser lento, não havendo uma verdadeira ulceração, nas infecções com *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. peruviana*^[31, 68]. O tempo de incubação varia entre uma a duas semanas até vários meses^[69].

Na leishmaniose cutânea, o doente geralmente apresenta-se com uma ou várias úlcera(s) ou nódulo(s) na pele, sem envolvimento visceral ou das mucosas. Embora estas lesões possam encontrar-se em qualquer parte do corpo, geralmente localizam-se nas áreas da epiderme descobertas, acessíveis aos flebótomos, tais como a face, antebraços e pernas^[11, 66]. A forma e o tamanho da lesão podem variar entre poucos milímetros até alguns centímetros de diâmetro^[42]. Por exemplo, lesões causadas por *L. tropica* e *L. infantum* normalmente são únicas e localizadas na face. No entanto, a doença causada por *L. major* tende a ser mais grave, afetando também os membros onde apresentam lesões múltiplas e, ocasionalmente, formam úlceras profundas^[11]. Em casos de múltiplas lesões, estas podem deixar cicatrizes desfigurantes, criando alterações estéticas e podem mesmo ser responsáveis por incapacidades no paciente^[4, 42]. A cura das lesões cutâneas ocorre, normalmente, de forma espontânea sem necessidade de terapêutica. Contudo, o tempo de cura varia com a espécie infetante e o local da lesão^[42].

^{66]}. Após a recuperação verifica-se que o organismo torna-se imune às espécies de *Leishmania* que causaram a doença, não ocorrendo a reinfeção^[42].

A leishmaniose cutânea 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^[68].

Em hospedeiros suscetíveis ou pessoas imunocomprometidas, a leishmaniose cutânea pode evoluir para leishmaniose cutânea difusa ou para leishmaniose mucocutânea^[22, 67]. A leishmaniose cutânea difusa é causada por *L. amazonensis* e *L. mexicana* no “Novo Mundo” e por *L. aethiopica* no “Velho Mundo”^[4]. Esta doença é uma forma rara de leishmaniose e caracteriza-se por lesões disseminadas pelo corpo, assemelhando-se a lesões leprosas. Não existe ulceração da lesão inicial, ocorrendo a disseminação para outros locais da pele através da corrente sanguínea, resultando frequentemente em lesões nodulares de tamanho variável em locais distantes do ponto inicial da picada do inseto^[4, 40]. Na leishmaniose cutânea difusa não ocorre cura espontânea e devido à disseminação das lesões o tratamento é difícil.

1.6.2. LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA

A leishmaniose mucocutânea é também denominada como “espundia”. Ocorre predominantemente no “Novo Mundo”, principalmente na Bolívia, Brasil e Peru, e é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis*. No “Velho Mundo”, apesar desta infecção ser rara, pode ser causada por diversas espécies (*L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*) e está relacionada com doentes de idade avançada ou imunodeprimidos^[4, 42].

Os primeiros sintomas clínicos de leishmaniose mucocutânea aparecem no local da picada, onde ocorre a formação de uma lesão semelhante à de leishmaniose cutânea. Contudo, ocorre a disseminação linfática ou hematogénica pelo organismo, causando metástases na mucosa da boca e trato respiratório superior^[4, 68]. A metastização secundária, característica desta doença, pode ocorrer meses ou anos após a picada do mosquito, tanto em pacientes cuja lesão primária ainda esteja presente, como em pacientes cuja lesão tenha sofrido cura espontânea^[31, 66]. As manifestações clínicas são as ulcerações progressivas e destrutivas da mucosa que se estendem desde o nariz e boca até à faringe e laringe^[5]. A mucosa e a cartilagem associadas são gradualmente degradadas, resultando na destruição extensiva e desfigurante das zonas do nariz, boca e garganta, o que torna a cirurgia reconstrutiva uma parte importante da terapia^[40, 67].

Devido à extensão do tecido afetado, as lesões quase nunca cicatrizam espontaneamente e é comum ocorrerem infecções bacterianas secundárias (exemplo a pneumonia), sendo estas a maior causa de morte associada à leishmaniose mucocutânea^[4].

1.6.3. LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral, também denominada de kala-azar, é a forma clínica mais severa de leishmaniose^[1, 40]. No “Velho Mundo” é causada pelas espécies *L. donovani* (no Sul da Ásia e África Oriental) e *L. infantum* (na Europa e Bacia do Mediterrâneo, incluindo o Norte de África). No “Novo Mundo” é causada por *L. chagasi* (espécie correspondente a *L. infantum*) com incidência na América Central e América do Sul, especialmente no Brasil^[42, 66]. Apesar da leishmaniose visceral ser predominantemente causada por parasitas do complexo *L. donovani*, no Médio Oriente foram reportados casos causados por *L. tropica*^[4, 66].

Após a picada do flebótomo ocorre a disseminação dos parasitas para células do sistema mononuclear fagocitário (maioria das vezes macrófagos) onde proliferam^[39]. A leishmaniose visceral consiste, assim, na infecção parasitária intracelular de fagócitos de órgãos linfóides, tais como o baço, linfonodos, medula óssea e fígado^[67, 70]. Um largo espectro de manifestações clínicas acompanha a infecção de *Leishmania* nos órgãos linfóides^[71]. Os sintomas mais comuns da leishmaniose visceral são febres irregulares prolongadas, diminuição do apetite, perda de peso progressiva, sinais de anemia e aumento do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia). Outros sintomas podem incluir tosse, diarreia persistente, escurecimento da pele, linfadenopatia e, em muitos casos, os sinais de doença renal crônica^[31, 72]. O período de incubação da doença é variável, semanas ou anos^[31]. Na ausência de tratamento, o paciente desenvolve pancitopenia (ou seja, diminuição da produção de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas), resultando na imunossupressão do sistema imunitário e, conseqüentemente, o paciente fica mais propenso a outras infecções. Nestes casos, a taxa de morte encontra-se próxima dos 100%, sendo as infecções secundárias as principais causas de morte^[39, 66]. A maioria dos indivíduos infetados permanecem assintomáticos, no entanto, a desnutrição e a supressão imunológica (nomeadamente a infecção pelo VIH) predispõem o homem à doença clínica com uma evolução aguda ou crônica^[4, 69].

A leishmaniose dérmica pós-kala azar (LDPK) é uma leishmaniose cutânea crônica, que aparece após a aparente cura da leishmaniose visceral, apesar de também serem relatados alguns casos em que o paciente não apresenta história clínica de leishmaniose visceral^[73]. A LDPK ocorre num subgrupo de pacientes que permanecem assintomáticos por meses ou anos,

desenvolvendo uma fulminante e progressiva proliferação de parasitas dentro da pele e origina lesões maculares, máculo-papulares ou nodulares^[66]. Tipicamente surge na face, mas pode, subsequentemente, afetar todas as partes do corpo, incluindo a conjuntiva, o nariz, a mucosa oral e genital^[73].

A LDPK é geralmente associada à infecção por *L. donovani*, ocorrendo predominantemente nas áreas onde a espécie é endêmica: África Oriental, especialmente no Sudão, e subcontinente indiano, nomeadamente em Bangladesh. Existem diferenças entre os dois continentes: na África Oriental, a LDPK afeta até cerca 50% dos pacientes podendo ocorrer logo após o tratamento da leishmaniose visceral; no subcontinente indiano, a LDPK tem uma incidência de 9,5% dos casos, geralmente após 2-3 anos do tratamento. Normalmente a LDPK não ocorre após uma infecção com *L. infantum*, contudo observou-se esporadicamente em pacientes coinfectados com VIH e *L. infantum*^[66, 73]. O tratamento da LDPK é demorado e dispendioso^[74].

1.7. EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses são doenças com distribuição geográfica mundial amplamente disseminadas, tanto em zonas intertropicais do Centro da América e África, como em regiões temperadas da América do Sul, Bacia Mediterrânica, Médio Oriente e no Centro e Sul asiático^[4, 31]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, atualmente o parasita é endêmico em 98 países, apresentando uma prevalência mundial de aproximadamente 12 milhões de casos e colocando em risco 350 milhões de pessoas^[4]. Estima-se que a incidência das leishmanioses seja de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos anuais, dos quais 300 000 são referentes a casos de leishmaniose visceral, e os restantes 1 000 000 às outras formas da doença (leishmanioses cutânea e mucocutânea). A incidência das leishmanioses não é uniformemente distribuída pelas áreas endêmicas. A leishmaniose visceral apresenta cerca de 90% dos casos no Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (Figura 8). A leishmaniose cutânea ocorre principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Irão, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia. A predominância de casos de leishmaniose mucocutânea é observada no Brasil, Peru e do Estado Plurinacional da Bolívia (Figura 9)^[22, 75].

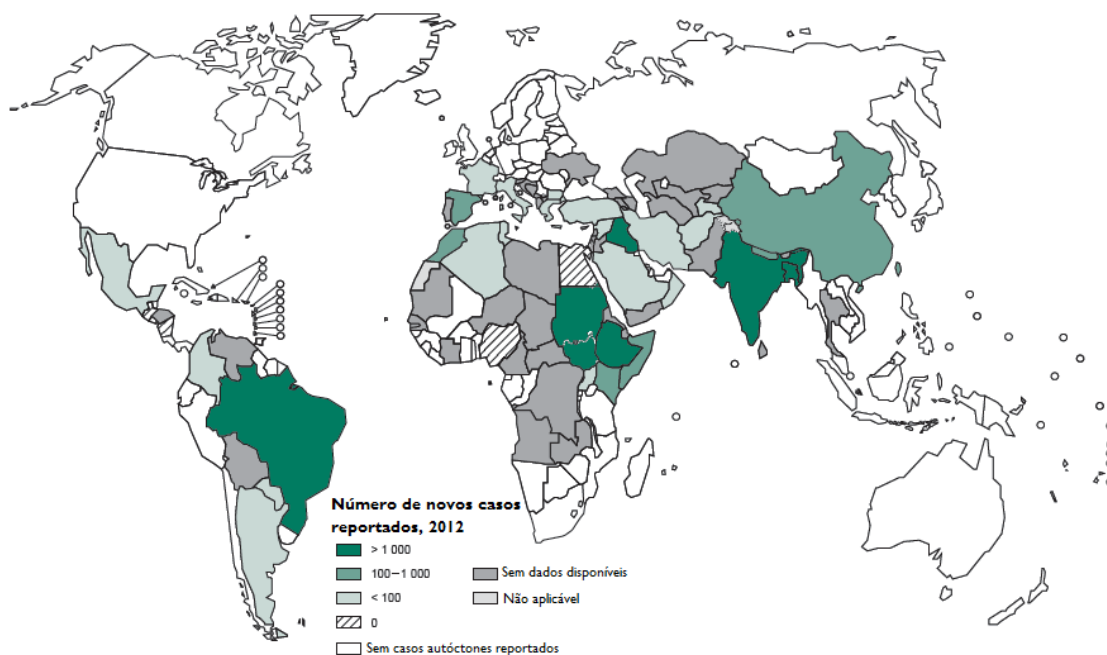


Figura 8 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral^[75].

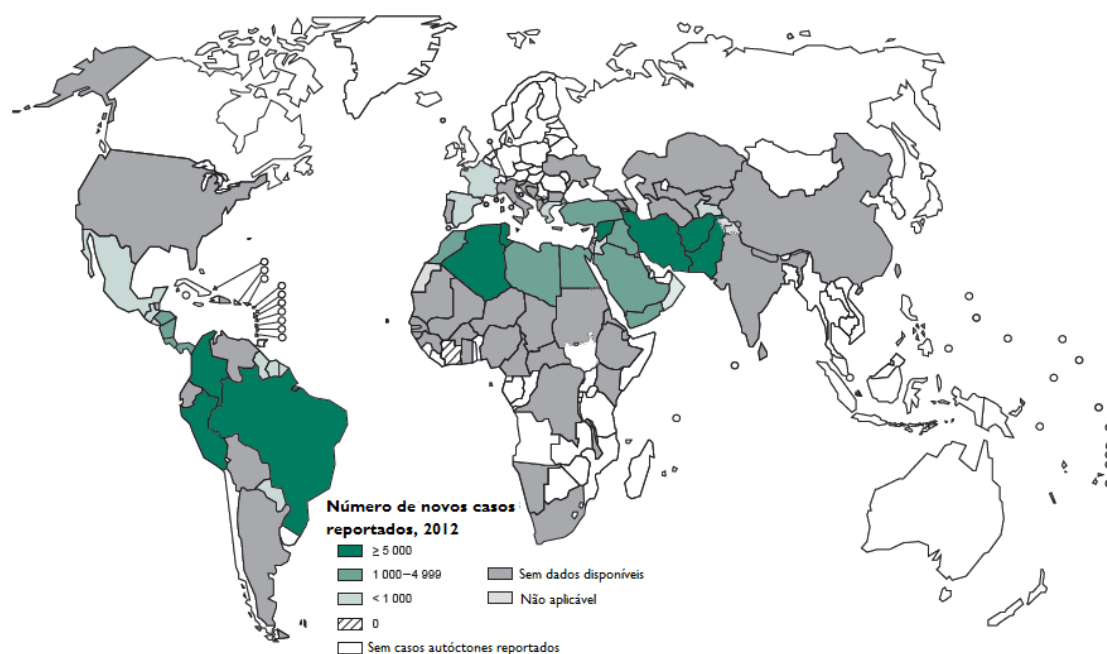


Figura 9 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea^[75].

Apenas aproximadamente 600 000 dos 1,3 milhões de casos estimados são notificados, sendo por isso o impacto desta doença na saúde pública subestimado^[75]. De facto, somente em 85 dos 98 países é obrigatório a notificação da doença, contribuindo para o número de casos reportados ser bastante inferior ao real. A leishmaniose, como muitas outras doenças negligenciadas, apresenta distribuição por países com localização remota, tornando difícil a

obtenção de fontes de dados oficiais. Por exemplo, embora não estejam reportados casos de leishmanioses no homem, na Mongólia foi encontrada uma estirpe de *L. major* geneticamente idêntica à encontrada em países com transmissão endêmica. O fato de existirem países listados como endêmicos, que não apresentam nenhuma notificação de casos humanos, geralmente reflete a ausência de vigilância ou de outras investigações^[76]. A inexistência ou a ignorância da população pelos programas de saúde e a não deslocação a centros de saúde por carências financeiras, tornam impossível o diagnóstico e o tratamento das leishmanioses.

Nos últimos anos, a incidência global de leishmanioses no homem parece ser mais elevada do que anteriormente. Contudo, é difícil diferenciar entre um aumento real e artificial. Se por um lado o número de casos notificados têm crescido devido à melhor consciencialização da doença e à melhoria das técnicas de deteção, da comunicação e da acessibilidade ao tratamento^[22], por outro, verifica-se que tanto as barreiras geográficas dos vetores como os fatores de risco para a propagação da doença têm aumentado^[4].

Atualmente, verifica-se uma alteração das barreiras geográficas da leishmaniose, induzida pela expansão do território habitado pelas espécies vetoriais^[67]. Principalmente as formas zoonóticas das leishmanioses têm sido influenciadas pelas atividades humanas, sobretudo devido à migração das zonas rurais para as zonas urbanas, desflorestação, mudanças ambientais e mudanças na ecologia dos vetores e reservatórios. Estes movimentos migratórios aumentam a exposição da população à doença, tanto pela migração para áreas endêmicas, sujeitando os migrantes ao contato com as populações ou ambientes infecciosos, como pela população migrante infetada ao expor o parasita a populações até então não expostas^[77]. Portanto, estes movimentos populacionais são considerados um fator de risco para a propagação da doença^[4, 31]. As mudanças ambientais que podem afetar a incidência de leishmaniose incluem a urbanização, a domesticação de reservatórios, e a incursão de explorações agrícolas e construção em áreas florestais^[4]. As características socioeconómicas são outro fator que afeta o risco de leishmaniose. A pobreza acresce o risco de infeção com o parasita de diversas formas. Normalmente, as condições sanitárias habitacionais são precárias (por exemplo, falta de gestão de resíduos, esgoto aberto), favorecendo a reprodução do flebótomo e locais de repouso, e, conseqüentemente, o seu acesso ao homem. A malnutrição da população é considerado um fator de risco visto que uma alimentação carenciada de proteínas, energia, ferro, vitamina A e zinco aumentam o risco de infeção. As alterações climáticas ostentam elevado impacto na leishmaniose. Esta doença é sensível ao clima, sendo fortemente afetada por mudanças na precipitação, temperatura atmosférica e humidade. Prevê-se que o aquecimento global, juntamente com a degradação do solo, afetem a epidemiologia da

leishmaniose. Desta forma origina alterações na distribuição, no tamanho populacional e na sazonalidade dos vetores, permitindo a transmissão do parasita em áreas anteriormente não endêmicas e podendo induzir o deslocamento em massa e a migração de populações^[4, 22, 31]. Outros fatores de risco com contribuição para o aumento do número de infetados é o aparecimento da leishmaniose como uma das doenças oportunistas em indivíduos infetados com VIH. Observa-se a maioria das coinfeções na forma visceral da doença^[4, 41], alterando os padrões tradicionais epidemiológicos da transmissão de *Leishmania*^[78]. Por exemplo, na Europa até 1985 (data do diagnóstico do primeiro caso de coinfeção), a doença manifestava-se predominantemente em crianças com idade inferior a 15 anos (aproximadamente 70% dos casos). Atualmente, cerca de 75% dos casos são observados em adultos, 50 a 60% dos quais são seropositivos^[79].

Até 2001 foram relatados casos de coinfeção com VIH em 35 países de todo o mundo (Figura 10), verificando-se a prevalência dos casos notificados em quatro países do Sudoeste da Europa: França, Itália, Portugal e Espanha^[50, 80]. Nestes países da bacia Mediterrânica, não se verificam epidemias, sendo o aparecimento de novos fatores imunossupressores responsável pelo aumento do número de casos de infeção humana (principalmente em adultos)^[41].

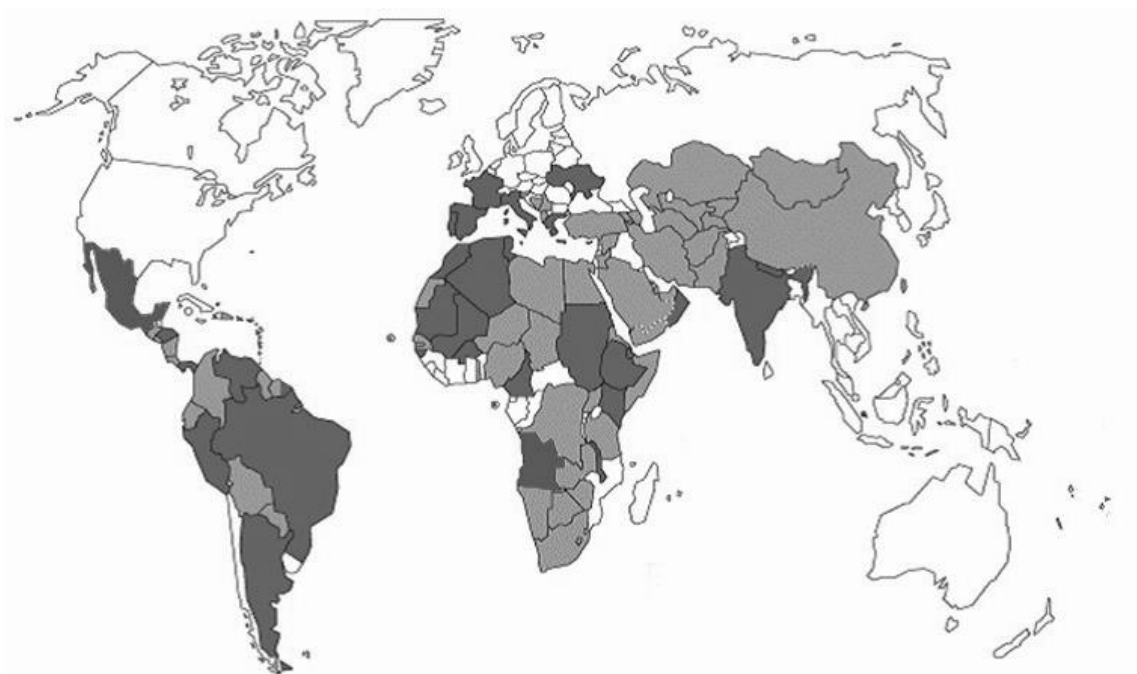


Figura 10 - Distribuição mundial da leishmaniose (■) e países que identificaram coinfeção *Leishmania*/VIH (■) até 2001^[50].

Na Europa verifica-se a ocorrência de dois ciclos de transmissão com longo endemismo comprovado: a leishmaniose humana visceral e cutânea (zoonóticas) causada por *L. infantum* e a leishmaniose humana cutânea (antroponótica) causada por *L. tropica* (Figura 11)^[52].

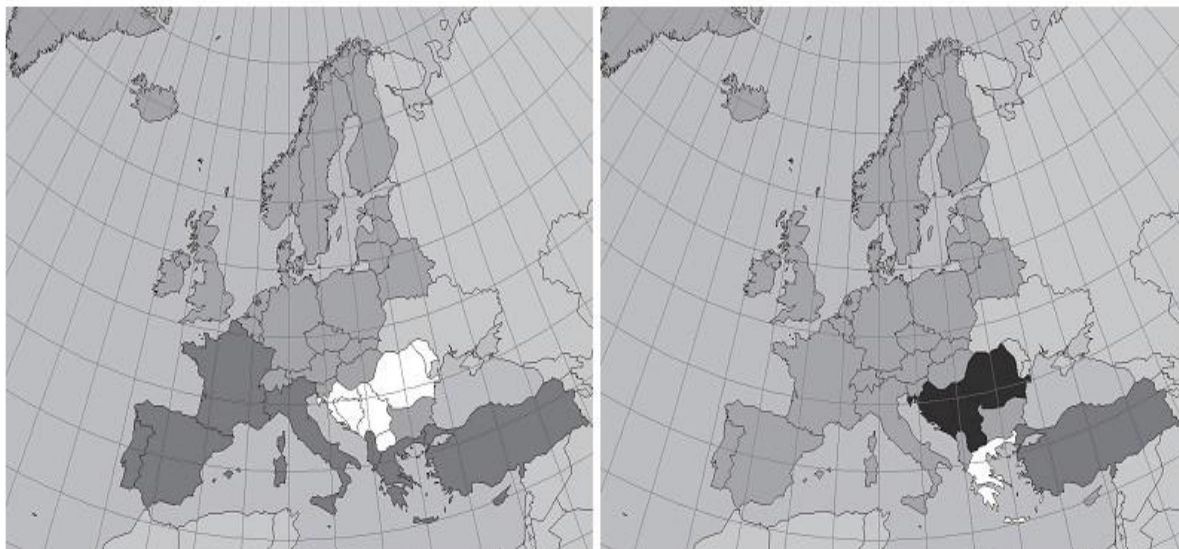


Figura 11 - Distribuição das espécies *L. infantum* (A) e *L. tropica* (B) nos países europeus até ao ano 2009: (■) espécie ausente; (■) espécie presente; (□) espécie esporádica; (■) infeções não caracterizadas^[52].

Em Portugal verifica-se a presença da espécie *L. infantum*, sendo as áreas endémicas a área Metropolitana de Lisboa, a península de Setúbal, o município rural de Alijó (Alto-Douro), o Algarve^[81] e a bacia hidrográfica do Baixo Mondego^[27]. Campino e Maia (2010) relataram que 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 leishmaniose visceral, 66 dos quais em indivíduos imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e 107 em adultos imunodeprimidos. A leishmaniose cutânea por *L. infantum* deverá ser considerada uma doença muito rara^[11]. Estudos apontam que a espécie responsável pela leishmaniose cutânea em Portugal seja *L. infantum* MON-I, podendo o tropismo de *L. infantum* para os tecidos cutâneos ou para os órgãos profundos, estar relacionado com o poder patogénico da estirpe parasitária e/ou com a genética e estado imunitário do hospedeiro^[82].

O número de casos de leishmaniose canina (LCan) tem aumentado em Portugal, sendo uma zoonose de notificação obrigatória desde 2002. Apesar de não ser evidente a relação direta entre a prevalência da leishmaniose canina e a da leishmaniose humana, considera-se que a presença de cães infetados desempenha um papel importante na manutenção da endemia da leishmaniose humana. A inexistência do plano nacional de diagnóstico e controlo de leishmaniose canina e a carência de informação sobre as leishmanioses, conduziu à criação do

Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish; www.onleish.org). O principal objetivo deste é a implementação e manutenção de uma rede de vigilância epidemiológica da LCan^[41]. Segundo o ONLeish, apesar de se verificarem casos esporádicos de LCan, as regiões portuguesas consideradas endémicas são: a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve (Figura 12). Estima-se que sejam também áreas endémicas as zonas do Alentejo, para além do concelho de Évora, e também algumas áreas do Ribatejo. Ou seja, a infeção canídea, quando comparada com a infeção humana, apresenta valores de incidência e prevalência muito superiores e uma distribuição mais extensa^[41]

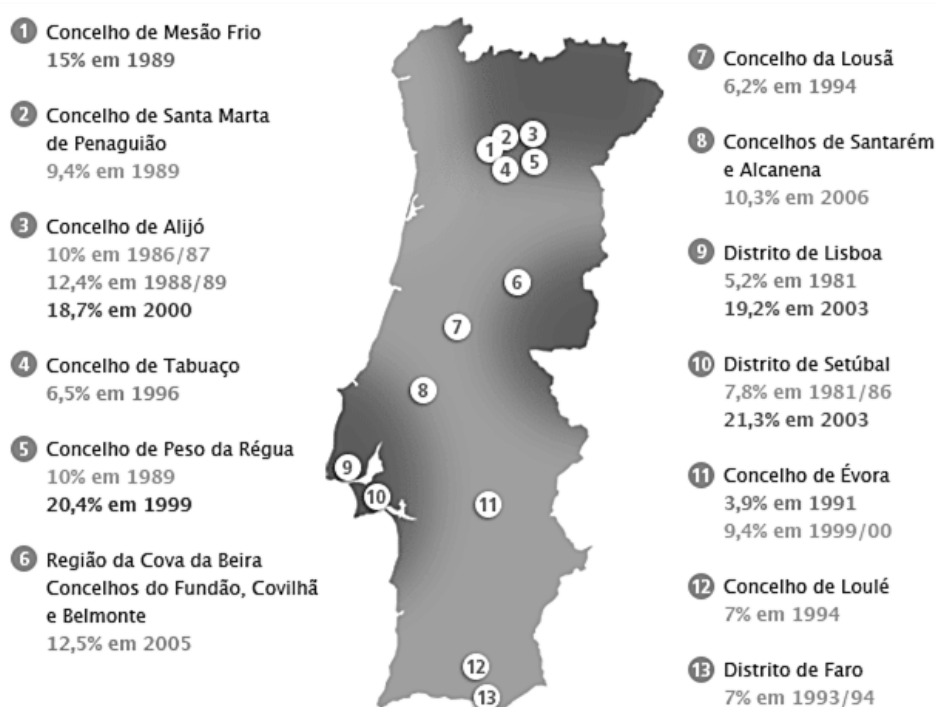


Figura 12 - Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal.

1.8. TRATAMENTO

A necessidade de tratamento está diretamente relacionada com a manifestação clínica da *Leishmania*, e apesar de nem sempre ser necessário (alguns casos menos graves de leishmaniose cutânea), em casos como o da leishmaniose visceral é essencial para a sobrevivência do indivíduo (cerca de 100% de morte quando paciente não é tratado). Não obstante, os fármacos atualmente disponíveis apresentam limitações, e em alguns casos verifica-se a ocorrência de mortes mesmo com o tratamento instituído. A falha terapêutica verifica-se em 50 a 70% dos tratamentos e ocorre nas diversas leishmanioses (leishmaniose

visceral, leishmaniose mucosa e algumas formas de leishmaniose cutânea) e em muitas das áreas endêmicas. A falta de sucesso resulta de alterações na farmacocinética dos fármacos, casos de reinfeções, debilitação do sistema imunológico do hospedeiro e do desenvolvimento de resistência ao fármaco^[83]. Os fármacos disponíveis apresentam também outras limitações devido à alta toxicidade, efeitos colaterais, elevado custo, duração longa do tratamento e modo de administração. Devido aos custos e duração do tratamento, alguns pacientes são incapazes de completar o tratamento, aumentando o risco do desenvolvimento de resistência^[84, 85].

Tendo em consideração estas limitações, a Organização Mundial de Saúde recomenda e apoia a investigação de novos medicamentos contra a leishmaniose. O desenvolvimento de novos compostos, a descoberta de alvos moleculares e novas abordagens terapêuticas para o tratamento das leishmanioses é uma necessidade urgente^[86, 87]. Todavia, a falta de retorno comercial significativo nas doenças negligenciadas (tais como leishmaniose), resultou num financiamento insuficiente, tanto por parte dos órgãos do setor público como da indústria farmacêutica. Apesar dos progressos significativos decorrentes nas últimas décadas, a identificação de novos compostos está longe de ser satisfatória^[86,88]. A inexistência de vacinas profiláticas ou preventivas torna mais difícil o controlo da doença, e apesar de já serem realizados alguns ensaios clínicos, nenhuma das vacinas demonstraram eficiência superior a 80% (não sendo viáveis os testes no homem)^[88, 89].

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é guiado pelos perfis de produtos-alvo (TPP), que consiste numa lista onde estão enumerados as características chave para potenciais novos medicamentos. No caso das leishmanioses essas características englobam a atividade contra as diversas leishmanioses, tratamento de curta duração, um medicamento na forma oral, um melhor perfil de segurança, custo inferior aos dos tratamentos atuais, estabilidade sob condições tropicais, entre outros^[90]. Desta forma, a tomada de decisão sobre a progressão do composto no processo de desenvolvimento de novos fármacos, deve ser tomada atendendo a estes critérios pré-definidos na TPP^[84, 90].

Atualmente são utilizadas duas abordagens na descoberta de medicamentos anti-*Leishmania*: a descoberta baseada na relação entre molécula e o alvo biológico (normalmente denominada de “target-based”) e a abordagem fenotípica (também chamada de “target-free”)^[84]. Para a abordagem da descoberta baseada no alvo, o passo inicial é a identificação e a validação de potencial alvo(s). Os estudos bioquímicos ou de exploração do genoma são algumas das ferramentas disponíveis para pesquisar e definir alvos^[90, 91]. Os principais alvos biológicos identificados são: a tripanotiona redutase, uma enzima envolvida na manutenção do

equilíbrio redox do parasita; a dihidrofolato redutase, necessária para a síntese *de novo* das purinas; proteases de cisteína, responsáveis pelo fator de virulência, segregada pela forma amastigota no fagolisossoma; e as ADN topoisomerasas, cuja estrutura difere do hospedeiro e que estão envolvidas na replicação e transcrição do ADN^[92]. A abordagem fenotípica é um método mais geral, que tem como alvo uma via metabólica ou simplesmente compostos com capacidade de eliminar o parasita. Esta abordagem baseada na viabilidade celular do parasita é uma solução simples e eficaz para a descoberta de novos fármacos anti-*Leishmania*. A maior vantagem desta técnica é que, em teoria, independentemente do alvo celular, um composto com elevada atividade contra o parasita e que não afecte o hospedeiro, pode tornar-se um fármaco^[84, 90].

Nos últimos anos são inúmeros os estudos realizados sobre a descoberta de alvos biológicos e vias metabólicas, resultando na descoberta de novas moléculas anti-*Leishmania*^[88]. Novos tratamentos para a leishmaniose foram introduzidos, enquanto outros estão em fase de testes clínicos^[93].

1.8.1.FÁRMACOS APROVADOS

Inicialmente os fármacos recomendados para o tratamento de leishmaniose restringiam-se aos antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e meglumina antimoniato). Ao longo do tempo formas alternativas e novas formulações de fármacos têm-se tornado disponíveis e registadas em alguns países, conduzindo a um avanço da terapia química disponível para o tratamento das leishmanioses.

1.8.1.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (pentostam) e meglumina antimoniato (glucantime) têm sido utilizados ao longo das últimas cinco décadas como primeira linha de tratamento de leishmanioses^[88, 94]. Independentemente da longa utilização dos antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose, o seu modo de ação não é totalmente conhecido^[86]. O modelo mais aceite para o mecanismo de ação considera que os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são pró-fármacos, uma vez que estes são convertidos no antimonial trivalente (Sb^{III}), a forma ativa. No entanto, o parasita parece ser também suscetível à forma Sb^V ^[88, 90]. O local de redução do fármaco (macrófagos, amastigota ou em ambos) e o mecanismo pelo qual ocorre (enzimático ou não enzimático) permanecem ainda por

esclarecer^[74, 90]. Há evidências de que Sb^{III} inibe a tripanotona redutase e a glutatona reductase^[84] e induz apoptose do parasita^[95].

No entanto, existem várias desvantagens inerentes à utilização dos fármacos antimoniais. Nos últimos anos tem sido reportado um aumento em larga escala de resistência clínica a estas moléculas^[96]. Por exemplo na Índia (mais concretamente no norte de Bihar, epicentro da região endêmica de leishmaniose visceral) ocorre uma significativa resistência aos antimoniais e, conseqüentemente, cerca de 65% dos tratamentos falham, tanto pela falta de resposta ao tratamento, como por recaídas^[74,96]. Outra desvantagem é o fato destes medicamentos serem altamente solúveis em água, não sendo absorvidos através da barreira intestinal e portanto são administrados por injeção intravenosa, intramuscular ou intralinfática^[84,97]. Este modo de administração é muitas vezes acompanhado de dor local durante injeções e de efeitos colaterais sistêmicos^[86]. Os efeitos secundários mais graves reportados são por exemplo a cardiotoxicidade e hepatotoxicidade e, conseqüentemente, a sua utilização requer uma cuidada supervisão clínica ou hospitalização^[98]. Outra limitação destes fármacos é a variação na resposta clínica das diferentes leishmanioses, leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea, sendo que esta diferença deverá ser intrínseca à sensibilidade das diferentes espécies^[99]. Apesar de todas estas limitações, os antimoniais pentavalentes continuam a ser a primeira linha de tratamento na África, América do Sul, Bangladesh, Nepal e Índia (exceto na zona norte de Bihar) na dose de 20mg / kg / dia por via parentérica durante 28-30 dias^[74, 100].

1.8.1.2. ANFOTERICINA

A anfotericina B (AmB) é um agente antifúngico poliênico com elevada atividade anti-*Leishmania*^[84,88]. Este fármaco tem provado ser altamente eficaz e dá resposta às limitações dos tratamentos com antimoniais (casos de resistências e de falha de resposta ao tratamento)^[101]. Apesar de ser um fármaco com uma elevada taxa de eficácia, a AmB apresenta também uma elevada toxicidade^[88, 94]. Com o intuito de melhorar as suas propriedades de biodisponibilidade e de farmacocinética foram desenvolvidas formulações onde o desoxicolato foi substituído por outros lípidos^[84,102]. Destas, destaca-se a Anfotericina B lipossomal (AmBL) que tem uma melhor penetração nas células e é mais eficaz em doses mais baixas, reduzindo a toxicidade. Não obstante, o elevado custo desta forma lipossomal limita a sua utilização^[52, 101]. Outras limitações são o modo de administração (por injeção intravenosa) e a falta de estabilidade em

alta temperatura (necessário manter a frio)^[84]. Apesar de raros, foram também reportados casos de resistência na Índia^[103].

O mecanismo de ação destes medicamentos deve-se à elevada afinidade para o ergosterol, esterol predominante nas membranas celulares de fungos e de *Leishmania*. A formação de complexos entre a AmB e os esteróis da membrana levam à abertura de poros que alteram o balanço iônico e conseqüentemente conduzem à morte celular^[88, 104].

1.8.1.3. PENTAMIDINA

A pentamidina é um derivado sintético da amidina e é eficaz contra grande número de protozoários patogênicos incluindo espécies de *Leishmania*. Desde a sua introdução em 1952, ostenta elevada importância no tratamento das leishmanioses^[101]. Apesar da sua ampla utilização em casos de resistência aos antimoniais, estudos demonstraram elevada toxicidade (hepatotoxicidade e cardiotoxicidade) e taxas de cura inferiores às obtidas com a anfotericina B. Além disso têm sido reportados casos de resistências ao tratamento^[52]. A sua importância está relacionada com a prevenção secundária em pacientes com VIH^[105].

A pentamidina liga-se à adenina e timina das sequências de ADN do cinetoplasto de *Leishmania* levando à destruição mitocondrial e conseqüentemente morte parasitária.

1.8.1.4. MILTEFOSINA

A miltefosina (hexadecilfosfocolina, HePC) é uma alquilfosfocolina e foi o primeiro medicamento oral eficaz a ser registado para o tratamento anti-*Leishmania* na Índia, em 2002^[94,106]. É um fármaco eficaz em casos de resistência aos antimoniais, tanto para a leishmaniose visceral como para a cutânea. Contudo, em algumas formas de leishmaniose a sua atividade é inferior aos de administração parenteral^[94]. Uma das limitações da miltefosina é a sua teratogenicidade que impossibilita o tratamento em grávidas e deve ser utilizado com precaução em mulheres com idade fértil^[52,94]. Os efeitos colaterais gastrointestinais são comuns, mas raramente suficientemente graves para justificar a interrupção do tratamento^[52]. Outros fatores limitantes da utilização da miltefosina são os custos do fármaco e indícios de resistência ao fármaco em áreas endêmicas^[107, 108].

O mecanismo de ação da miltefosina pode ser através da alteração do metabolismo lipídico causando a apoptose de *Leishmania*. Também foi demonstrado que a miltefosina atua ao nível

da célula hospedeira, estimulando a produção de óxido nítrico, conduzindo à morte do parasita no interior do macrófago^[84].

1.8.1.5. PARAMOMICINA

O antibiótico aminoglicosídeo paramomicina foi aprovado em 2006 para o tratamento da leishmaniose na Índia^[107,109]. As leishmanioses visceral e cutânea podem ser tratadas com este antibiótico mas a pobre absorção oral levou ao desenvolvimento de formulações parentéricas (administrada para a leishmaniose visceral) e tópicas (administrada em leishmaniose cutânea)^[84, 94].

O mecanismo de ação está relacionado com a capacidade da paramomicina se ligar à subunidade 30S ribossomal, levando à terminação prematura da tradução do mRNA e consequentemente à inibição da síntese proteica. Em *Leishmania*, a paramomicina também afeta o funcionamento mitocondrial^[88, 101].

1.8.1.6. SITAMAQUINA

A sitamaquina (um análogo 8-aminoquinolona de primaquina) foi o segundo fármaco oral a ser aprovado para o tratamento de leishmaniose na Índia. A sitamaquina é eficaz no tratamento de leishmaniose visceral e é geralmente bem tolerada. Os efeitos secundários parecem ser relativamente suaves: problemas gastrointestinais, dor de cabeça e casos de leve meta-hemoglobinemia^[110, 111]. Em doses elevadas (utilizadas em ensaios clínicos na Índia) os efeitos secundários mais comuns foram vômitos, dispepsia, nefrotoxicidade e cianose secundária^[52, 88]. Este fármaco tem sido utilizado em pacientes isolados ou para uso compassivo em coinfeções de *Leishmania* com VIH^[112].

Sitamaquina afeta a motilidade, morfologia e crescimento do parasita. Fortes evidências sugerem que o mecanismo de ação envolve a interação eletrostática entre os grupos dos fosfolípidos aniônicos polares e a sitamaquina (molécula carregada positivamente) causando a inserção do fármaco dentro das membranas biológicas. Após à ligação à membrana, a sitamaquina é acumulada nos acidocalcissomas de *Leishmania* causando a alcalinização destes compartimentos ácidos. No entanto, a correlação entre a ação e a acumulação da sitamaquina não é clara^[101,113] e verificou-se também que o fármaco induz a cadeia de transporte de elétrons da membrana mitocondrial^[101, 110].

1.8.2.COMPOSTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*

A investigação de produtos naturais como uma fonte de novas terapias demonstrou ser uma abordagem simples para a descoberta de novos compostos com propriedades quimio-terapêuticas. A necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses e importância atribuída às plantas medicinais como fonte valiosa de novos agentes medicinais, conduziu à realização de inúmeros estudos de rastreio de produtos (extratos de planta em bruto, frações semi-purificadas e de moléculas quimicamente definidas) em espécies de *Leishmania*^[114,115]. Nesses estudos foram identificados diversos compostos naturais com atividades leishmanicidas promissoras^[115]. No estudo de Rocha e colaboradores os compostos ativos isolados e identificados pertencem a classes estruturais distintas, sendo as mais comuns os alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, lactonas, quinóides, flavonoides, diterpenos e esteroides^[114]. Idealmente, a modificação química destes produtos naturais pode melhorar significativamente a sua atividade mantendo os baixos níveis de toxicidade, sendo por isso uma área de interesse crescente na descoberta de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*^[116].

1.8.1.1.BETULINA E ÁCIDO BETULÍNICO

A betulina (lup-20(29)-eno-3 β ,28-diol, C₃₀H₅₀O₂) é um triterpeno pentacíclico pertencente à classe dos lupanos (Figura 13). Estruturalmente é constituída por um esqueleto de 30 carbonos, organizados em quatro anéis (A, B, C e D) de seis membros, num anel E com cinco membros e com um grupo isopropenilo na carbono 20 (C20)^[117]. Foi um dos primeiros produtos naturais a ser identificado e isolado, em 1788 por Lowitz^[117, 118]. A betulina é um composto abundante na natureza, encontrado de forma generalizada no reino vegetal, especialmente nas espécies de bétula (*Betula alba*, *Betula pendula*, *Betula pubescent* e *Betula platyphylla*). O composto é extraído das cascas de bétula, sendo que nas de cor branca consegue-se obter cerca de 30% do peso total^[119, 120]. A betulina é considerada pouco ativa, mas pode ser utilizado como composto de partida para a obtenção de derivados com um amplo espectro de propriedades farmacológicas^[121, 122]. Este triterpeno pentacíclico pode ser facilmente convertido em ácido betulínico, um composto mais ativo, através de uma reação de dois passos e com rendimento de 75%^[123, 124]. As estruturas químicas destes dois compostos diferem apenas no grupo ligado ao C17 (Figura 13: (1) betulina; (2) ácido betulínico)^[122].

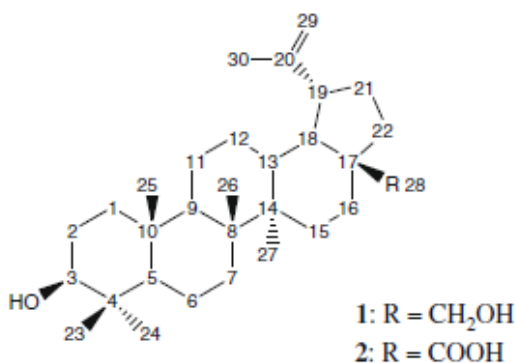


Figura 13 - Estrutura química da (1) betulina e do (2) ácido betulínico^[126].

O ácido betulínico (ácido 3β-hidroxi-lup-20(29)-en-28-oíco) é extraído das mesmas plantas que a betulina, contudo em concentrações inferiores, 2,5% do peso total da casca de bétula branca^[122, 125].

As estruturas da betulina e do ácido betulínico possibilitam facilmente a realização de modificações químicas em três sítios distintos: no grupo hidroxilo secundário da posição C3, na porção de alceno da posição C20 e no grupo hidroxilo primário da posição C28. Estas transformações estruturais podem produzir derivados potencialmente importantes, tornando-as interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos^[125, 126].

Os derivados betulínicos possuem um largo espectro de atividade biológica e farmacológica: atividades anticancerígenas, antivirais (anti-VIH, anti-HSV I, anti-alfavírus), anti-bacteriana, anti-malárica, anti-inflamatória, antinociceptivo, anti-inflamatórias e efeitos anti-helmínticos^[118, 123].

1.8.2.2. DERIVADOS BETULÍNICOS COM ATIVIDADE ANTI-*Leishmania*

Na literatura são encontrados alguns estudos que relatam a atividade anti-*Leishmania* de derivados da betulina e do ácido betulínico^[8].

Sauvain e colaboradores isolaram um aldeído betulínico (Figura 14 derivado 1) que demonstrou atividade *in vitro* contra as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*^[127]. No entanto, estas doses também mostraram toxicidade contra macrófagos peritoneais com índices de sobrevivência de 70% e 80%, respetivamente^[127, 128].

Num outro estudo, Chowdhury e colaboradores verificaram que o ácido di-hidrobetulínico (Figura 14 derivado 2) inibe o crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. donovani*^[129]. A atividade deste composto deve-se à sua ação inibitória sobre as ADN topoisomerasas I e II, induzindo a apoptose do parasita. Em testes laboratoriais com hamsters dourados verificou-

se que após seis semanas de tratamento com o ácido di-hidrobetulínico ocorreu a redução de 92% dos parasitas. Em um estudo posterior, foram testados derivados da betulina e da di-hidrobetulina em culturas *L. donovani* sensíveis e resistentes aos antimoniais^[120]. Os derivados onde foram inseridos grupos carboxílicos menores (com grupos succinil e glutaril) formando ésteres mais pequenos (Figura 14 derivados 3, 4 e 5), foram ativos contra ambas as estirpes de *L. donovani*. O mecanismo bioquímico sugerido para estes derivados betulínicos foi semelhante ao do ácido di-hidrobetulínico, onde se verificou a inibição reversível da atividade da topoisomerase I^[120].

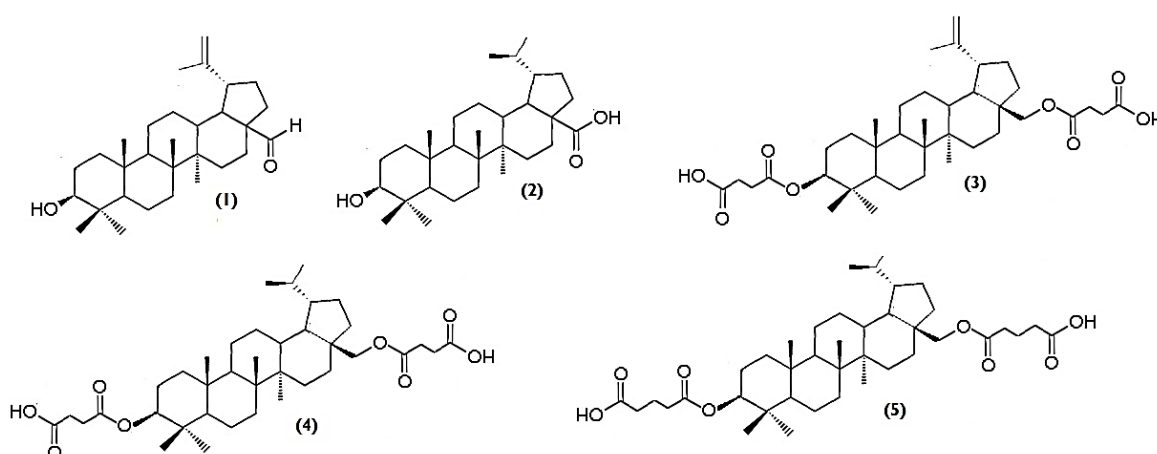


Figura 14 - Estrutura química dos derivados da betulina e da di-hidrobetulina com atividade leishmanicida: (1) aldeído betulínico; (2) ácido di-hidrobetulínico; (3) 3-O, 28-O-di-succinil-betulina; (4) 3-O, 28-O-di-succinil-di-hidrobetulina e (5) 3-O, 28-O-di-glutaril-di-hidrobetulina^[120, 127].

Takahashi e colaboradores pesquisaram a atividade anti-*Leishmania* de compostos pertencentes a uma biblioteca de compostos naturais^[130]. Nesta pesquisa foi identificado o ácido betulínico com atividade contra *L. major*. Num estudo posterior, a atividade da betulina e de derivados betulínicos foram testados em culturas de *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*, nomeadamente ácido betulínico, ácido acetilbetulínico (Figura 15 derivado 6), ácido betulónico (Figura 15 derivado 7) e betulinato de metilo (Figura 15 derivado 8)^[130]. Os resultados mostraram também que as modificações do grupo hidroxilo em C3, tanto por reações de esterificação (formação de ácido acetilbetulínico 6) como de oxidação (formando o ácido betulónico 7), resultaram num aumento significativo de atividade anti-*Leishmania* contra *L. amazonensis*. O efeito das modificações no grupo carboxilo C28 não foi claro, no entanto a melhor atividade contra *L. braziliensis* foi verificada na presença do betulinato de metilo (8)^[131].

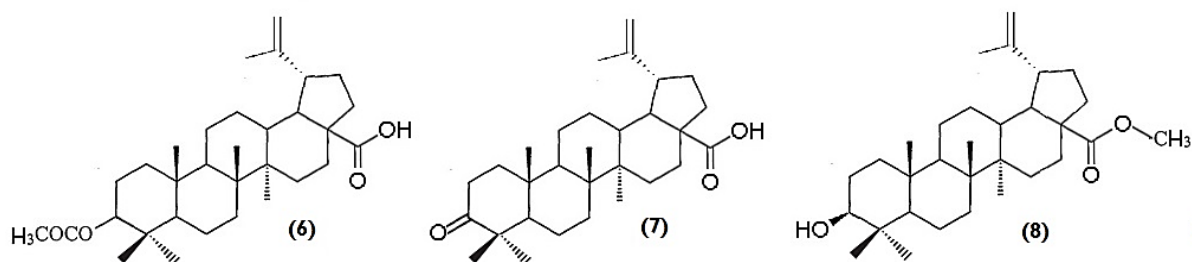


Figura 15 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida: (6) ácido acetilbetulínico; (7) ácido betulínico e (8) betulinato de metilo^[131].

Em 2010, Alakurtti e colaboradores verificaram que a inserção de grupos carbonilo e carboxilo em C3 e/ou C28 aumentaram a atividade anti-*Leishmania*^[119]. Num outro estudo demonstraram que a inserção de heterocíclicos nos derivados da betulina, nomeadamente a introdução de grupos triazóis, tem um impacto positivo sobre a atividade anti-*Leishmania*^[128]; o derivado mais eficaz contra as formas amastigotas de *L. donovani* foi o heterocíclico representado na Figura 16, em que R₁ é um grupo metilo e R₂ um grupo acilo. No entanto, também foi verificada alguma toxicidade para a linha de células de macrófagos. De um modo geral, a substituição com grupos mais volumosos diminui a atividade leishmanicida, como foi observado nos derivados betulínicos^[128].

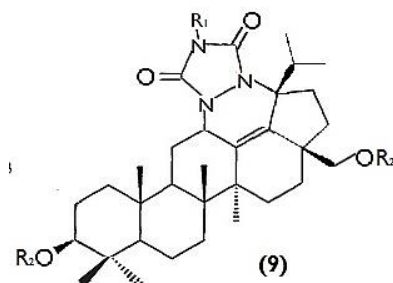


Figura 16 - Estrutura química do derivado betulínico com adição de heterocíclico na cadeia lupano com atividade leishmanicida onde R₁=Me e R₂=Ac^[128].

Diversos derivados do ácido betulínico de *Cornus florida* foram avaliados em promastigotas de *L. tarentolae*^[132]. Os dois ésteres fenólicos naturais, ácidos 3-β-O-cis-cumaroil e o 3-β-O-trans-cumaroil betulínico (Figura 17, derivados 10 e 11), apresentaram atividade anti-*Leishmania*. Estes resultados demonstraram que a adição de grupos cumaroil em C3 incrementa a atividade leishmanicida dos derivados betulínicos e que a estereoquímica da ligação dupla não influencia significativamente a atividade^[132].

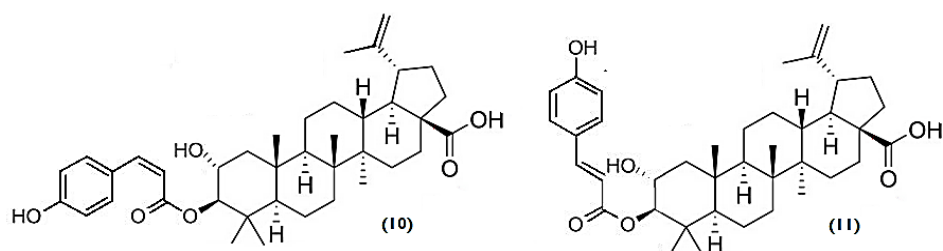


Figura 17 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida: (10) ácido 3-β-O-cis-cumaroil betulínico e (11) ácido 3-β-O-trans-cumaroil betulínico^[132].

Num estudo mais recente, Sousa e colaboradores demonstraram atividade antiparasitária de derivados da betulina e do ácido betulínico (carbamatos e N-acilimidazóis) na espécie *L. infantum* (Figura 18)^[8]. Os resultados obtidos indicaram que nos derivados da betulina, as modificações em C20 e em C30 conduzem a um aumento da atividade anti-*Leishmania*^[8].

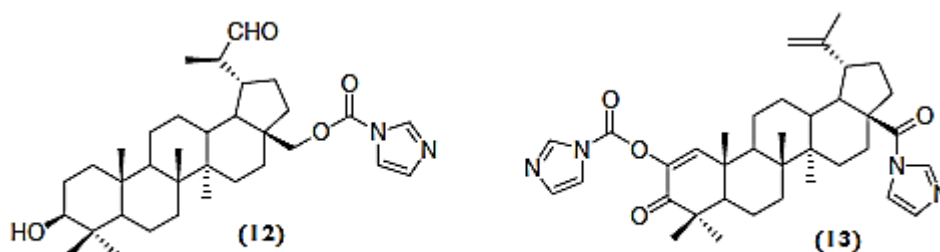


Figura 18 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida: (12) 28-N-acilimidazole e (13) 2-Carbamato 28-N-acilimidazole^[8].

Haavikko e colaboradores sintetizaram diversos derivados da betulina, ácido betulínico e do ácido betulónico, através da inserção de adutos heterocíclicos na posição C28^[133]. A análise de estrutura-atividade obteve resultados contraditórios quanto à importância do grupo carboxilo no C28 para a atividade leishmanicida. Os compostos mais ativos foram os derivados 14 e 15 (Figura 19)^[133].

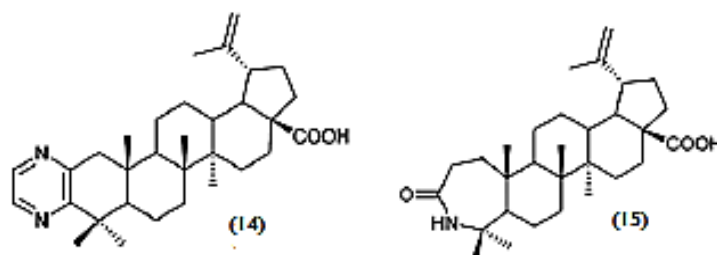


Figura 19 - Estrutura química dos derivados betulínicos com atividade leishmanicida: (14) Adição de anel heterocíclico e (15) com substituição do anel A^[133].

CAPÍTULO II

2.OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral a preparação de triterpenóides do tipo lupano e a avaliação da sua atividade antiparasitária em tripanossomatídeo *Leishmania*.

Para o cumprimento do objetivo geral, foi desenvolvido um plano de trabalho com os seguintes objetivos específicos:

- Síntese de derivados da betulina e do ácido betulínico;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* de derivados betulínicos em promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Análise da estrutura/atividade dos derivados de modo a indicar um potencial modelo para o desenvolvimento de novos derivados com melhor atividade anti-*Leishmania*;
- Caracterizar a atividade anti-*Leishmania* quanto aos mecanismos envolvidos, avaliando os seus efeitos sobre o ciclo celular e a morfologia das promastigotas de *L. infantum*.

CAPÍTULO III

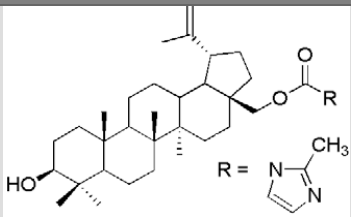
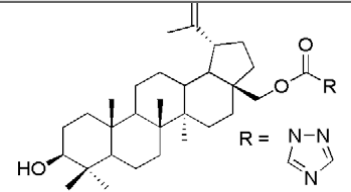
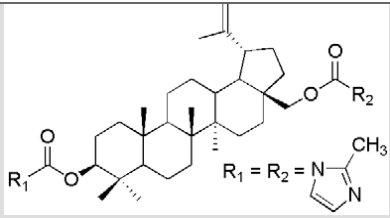
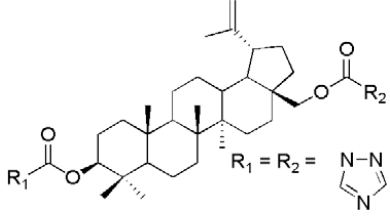
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COMPOSTOS

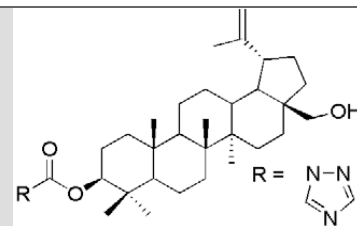
3.1.1. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS UTILIZADOS

Os vinte derivados da betulina e do ácido betulínico foram inicialmente sintetizados como parte integrante de uma extensa biblioteca de compostos com atividade anti-tumoral. Nas tabelas seguintes (Tabelas II e III) estão representadas as estruturas químicas dos compostos. Todos os derivados de betulina e ácido betulínico foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (10 mM) e armazenadas a -20°C .

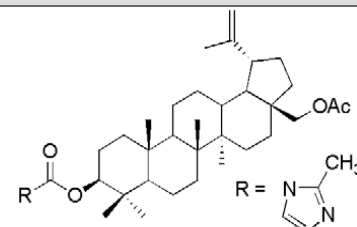
Tabela II - Derivados da betulina e respetiva estrutura química.

Derivado	Nomenclatura segundo a IUPAC	Fórmula estrutural
I1	(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 3 β -Hidroxi-lup-20(29)-en-28-ilo	
I2	(1H-triazole-1-il)-carboxilato de 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-ilo	
I3	(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de lup-20(29)-en-3 β ,28-di-ilo	
I4	(1H-triazole-1-il)-carboxilato de lup-20(29)-en-3 β ,28-di-ilo	

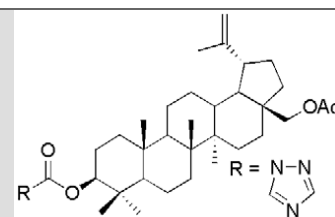
15 (1H-triazole-1-il)-carboxilato de 28-hidroxi-lup-20(29)-en-3β-ilo



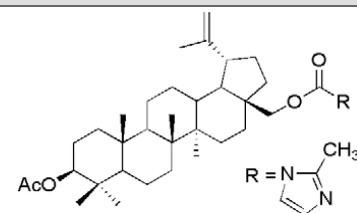
16 (2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 28-acetoxi-lup-20(29)-en-3β-ilo



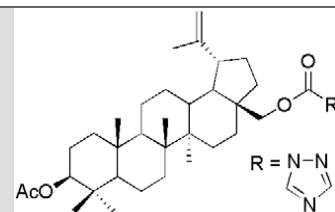
17 (1H-triazole-1-il)-carboxilato de 28-acetoxi-lup-20(29)-en-3β-ilo



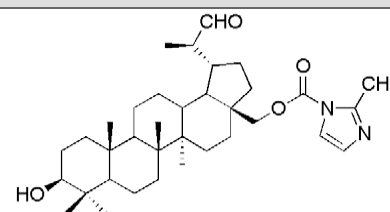
18 (2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 3β-acetoxi-lup-20(29)-en-28-ilo



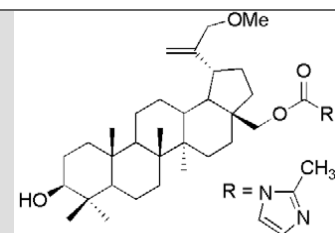
19 (1H-triazole-1-il)-carboxilato de 3β-acetoxi-lup-20(29)-en-28-ilo



20 (2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-(20R)-lupan-29-oxo-28-ilo



21 (2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 3β-hidroxi-30-metoxi-lup-20(29)-en-28-ilo



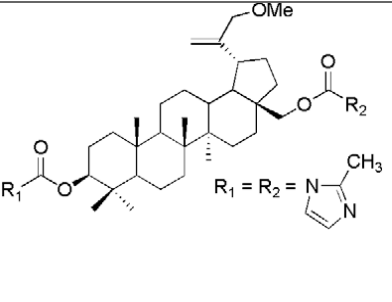
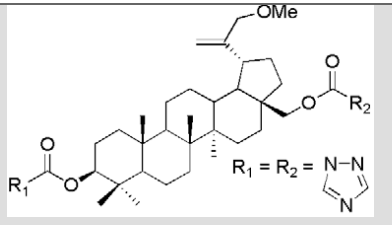
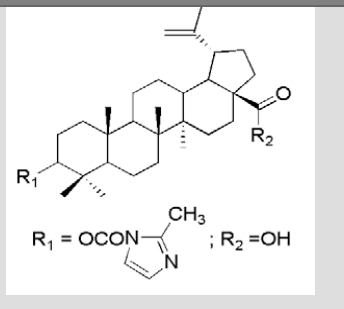
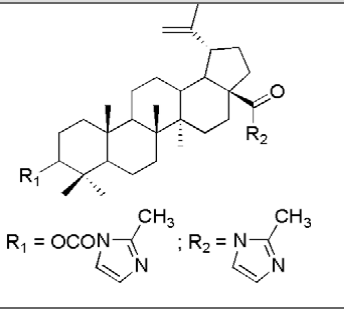
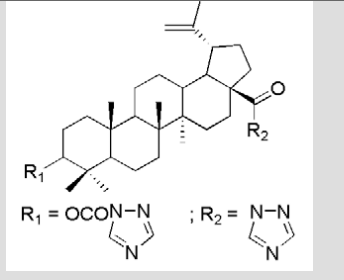
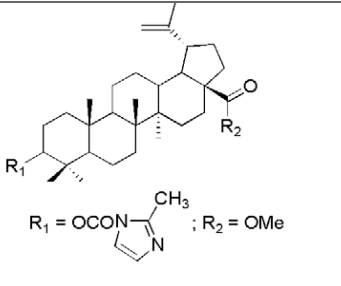
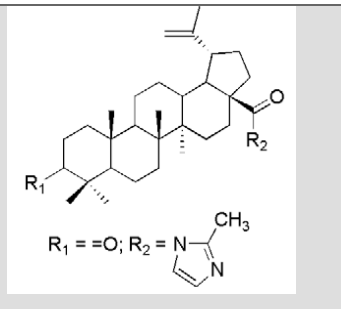
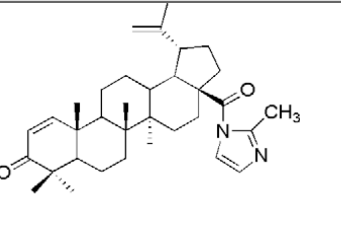
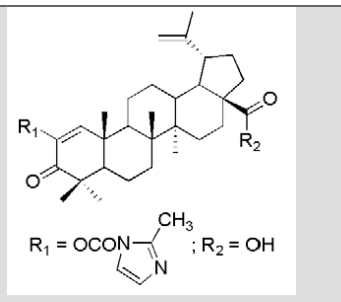
<p>23</p>	<p>(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 30-metoxi-lup-20(29)-en-3β,28-di-ilo</p>	
<p>24</p>	<p>(1H-triazole-1-il)-carboxilato de 30-metoxi-lup-20(29)-en-3β,28-di-ilo</p>	

Tabela III - Derivados do ácido betulínico e respetiva estrutura química.

Derivado	Nomenclatura segundo a IUPAC	Fórmula estrutural
<p>25</p>	<p>Ácido 3β-(2'-metil-1H-imidazole-1-carboxiloxi)-lup-20(29)-en-28-óico</p>	
<p>26</p>	<p>(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-carboxilato de 28-(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-28-oxo-lup-20(29)-en-3β-ilo-</p>	
<p>27</p>	<p>(1H-triazole-1-il)-carboxilato de 28-(1H-triazole-1-il)-28-oxo-lup-20(29)-en-3β-ilo</p>	

28	3 β -(2'-metil-1H-imidazole-1-carboniloxi)-lup-20(29)-en-28-oate de metilo	 <p>$R_1 = \text{OCON} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N} \end{array}$; $R_2 = \text{OMe}$</p>
29	28-(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-lup-20(29)-en-3,28-diona	 <p>$R_1 = =\text{O}$; $R_2 = \text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N} \end{array}$</p>
30	28-(2'-metil-1H-imidazole-1-il)-lup-1,20(29)-dien-3,28-diona	
31	Ácido 2-(2'-metil-1H-imidazole-1-carboxiloxi)-3-oxo-lup-1,20(29)-dien-28-óico	 <p>$R_1 = \text{OCON} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{N} \end{array}$; $R_2 = \text{OH}$</p>

3.1.2. DESCRIÇÃO DA SÍNTESE DOS COMPOSTOS

A síntese dos derivados da betulina e do ácido betulínico foi realizada pelo grupo liderado pelo Professor Jorge Salvador do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e foi reportada por Santos e colaboradores, em 2010.

Um método para a introdução de anéis heterocíclicos na estrutura triterpenóide é através da reação com 1,1'-carbonildiimidazole (CDI), 1,1'-Carbonilbis(2-metilimidazole) (CBMI), ou 1,1'-carbonil-di(1,2,4-triazole) (CDT) (Figura 20) em tetra-hidrofurano (THF), sob refluxo e em atmosfera inerte. Nesta reação o grupo carbonilo do reagente imidazole é atacado pelos grupos hidroxilos dos álcoois ou ácidos carboxílicos presentes na estrutura.

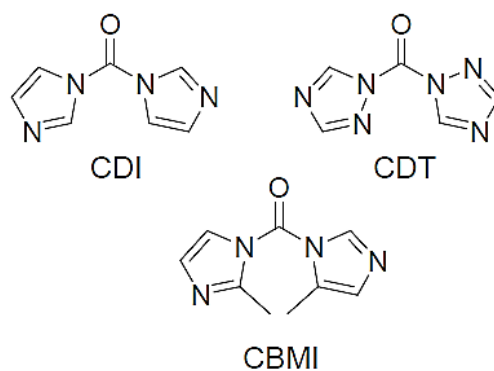


Figura 20 - Estrutura química dos reagentes 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), 1,1'-carbonylbis(2-metilimidazole) (CBMI), e 1,1'-carbonyl-di(1,2,4-triazole) (CDT)

Consoante a natureza reativa do álcool ou ácido carboxílico, bem como das condições utilizadas podemos obter N-alquilimidazóis, ésteres carboxílicos de imidazole (carbamatos), ou imidazóis (Figura 21)^[126, 134].

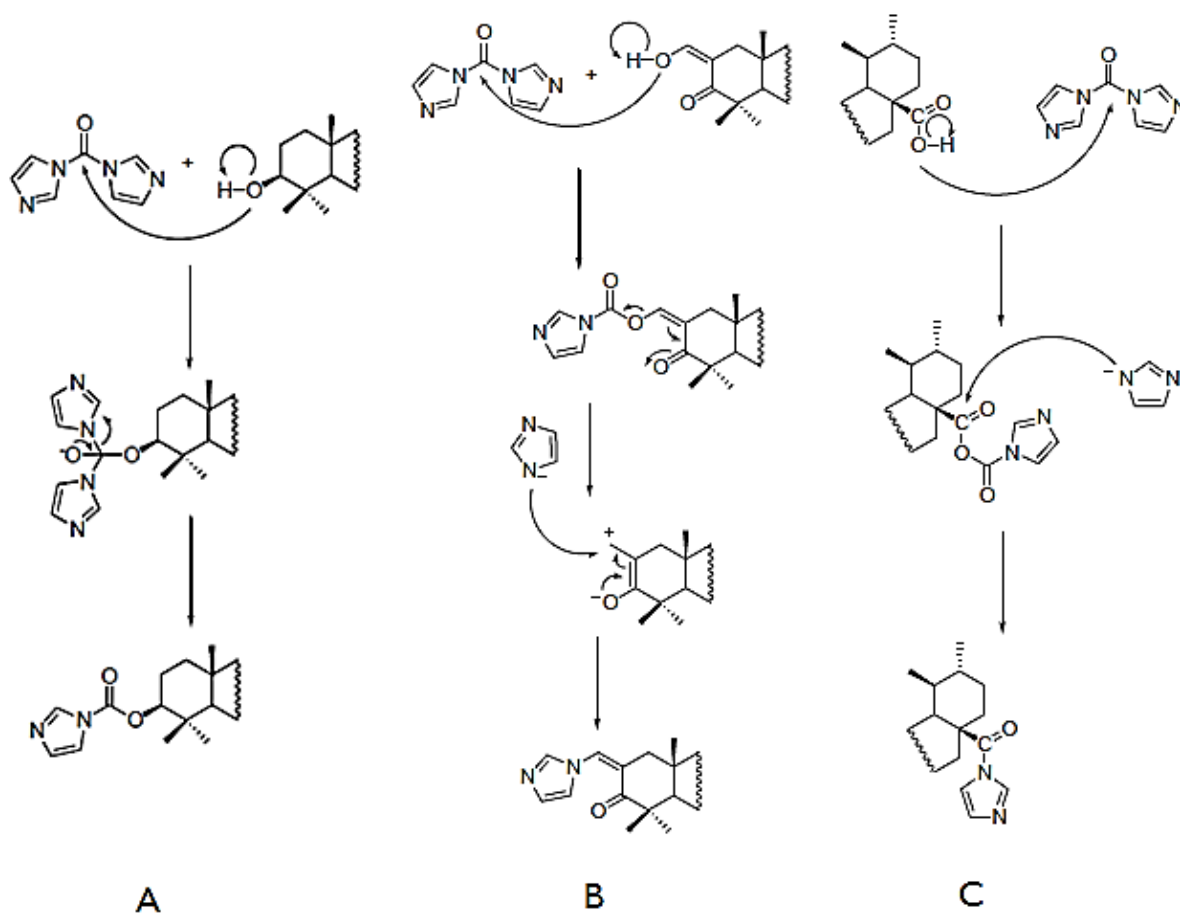


Figura 21 - Mecanismo reacional dos terpenóides CDI e formação de (A) carbamatos, (B) N-alquilimidazóis e (C) imidazóis.

A título de exemplo da síntese de derivados carbamatos imidazóis e triazóis, apresenta-se a reação da betulina (**I**) com o CBMI, em THF seco sob azoto (N_2), sob refluxo, obtendo-se os derivados imidazóis **11** e **13** (Figura 22), ou seja uma mistura de compostos mono e dissustituídos. Nos casos dos compostos triazóis **12** e **14**, foi realizada uma reação entre a betulina (**I**) com o CDT, sob as mesmas condições^[135].

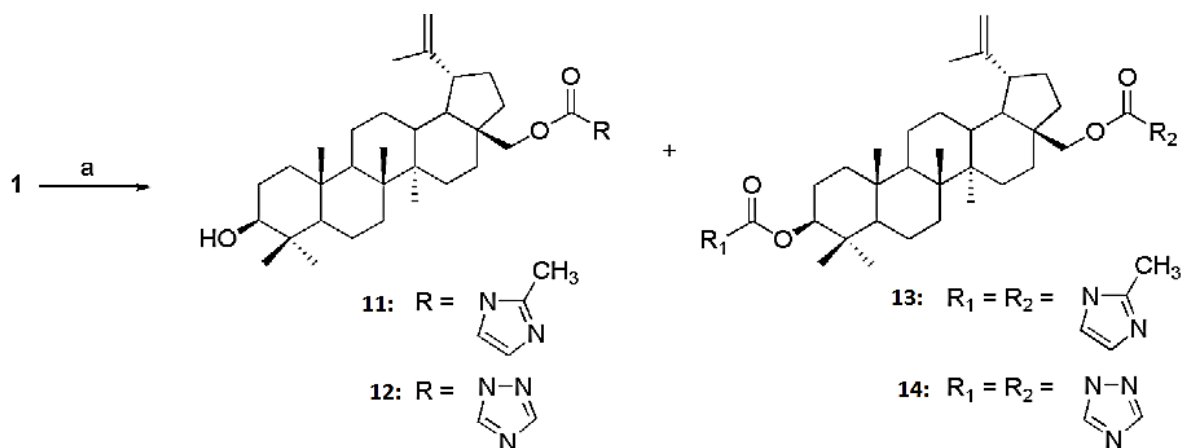


Figura 22 - Representação da síntese dos derivados 11-14 da betulina. Os reagentes e condições: (a) CBMI ou CDT, THF seco, N_2 , refluxo.

3.1.2.1. PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

Os solventes utilizados foram adquiridos na VWR (Portugal), enquanto os diversos compostos (betulina, ácido betulínico, o CBMI, o CDT) foram comprados na Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri). Para a análise de cromatografia em camada fina (TLC), foi usado Kieselgel 60HF254 / Kieselgel 60G e a FCC foi realizada com Kieselgel 60 (230-400 mesh da Merk). Os espectros de infravermelhos foram obtidos usando um espectrofotómetro JASCO FT / IR-420. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram gravados num aparelho de 300 Bruker Digital NMR-Avance 400, em um aparelho Bruker Digital NMR-Avance com $CDCl_3$ e o Me_4Si foi utilizado como padrão interno. A elucidação das estruturas químicas foi baseada em espectros de RMN, nomeadamente espectros 1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC. Os valores de desvios químicos (δ) são dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) são apresentadas em Hz. Os espectros de massa foram realizados em um equipamento tipo *ion-trap*, marca Thermo Finnigan, modelo Polaris Q GC/MS.

3.1.2.1.1. PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DE DERIVADOS 2-METILIMIDAZÓIS

Foi preparada uma solução de betulina **I** (200 mg, 0,45 mmol) em THF anidro (8 ml), a qual se adicionou CBMI (238 mg, 1,35 mmol). Através do controlo de TLC verificou-se que reação completa ocorreu após 9 horas sob agitação magnética à temperatura de refluxo e atmosfera de N₂. A mistura de reação foi vertida em água (30 ml) e extraída com éter dietílico (3X30 mL). O extracto orgânico obtido foi em seguida lavado com água (30 ml), e água saturada (30 ml), seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e concentrado sob pressão reduzida de forma a obter um sólido de cor amarela. Este sólido foi submetido a FCC com éter de petróleo (40-60°C) / acetato de etilo (proporção de 4: 1), originando o derivado 2-metilimidazole **II** (143 mg, 57%): P.f. (benzeno) 163-165°C; IV (filme) M_{máx} 3313, 3073, 1758, 1642, 884 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,38 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-5'), 6,91 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-4'), 4,72 (br s, 1H, H-29_a), 4,62–4,59 (m, 2H, H-29_b e H-28_a), 4,17 (d, J = 10,9 Hz, 1H, H-28_b), 3,19 (dd, J = 10,8 Hz, J = 5,2 Hz, 1H, H-3α), 2,71 (s, 3H, CH₃-2'), 2,47 (m, 1H, H-19), 1,70 (s, 3H, H-30), 1,06 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 0,83 (s, 3H), 0,77 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 149,6 (C20), 149,5 (OCO), 147,9 (C2'), 126,5 (C4'), 118,1 (C5'), 110,2 (C29), 78,8 (C3), 67,3 (C28); EI-MS m/z (% intensidade rel.): 550 (10) M⁺, 189 (26), 187 (26), 133 (25), 119 (37), 107 (28), 91 (30), 83 (100), 81 (27), 79 (26).

3.1.2.1.2. PROCEDIMENTO GERAL PARA A OBTENÇÃO DE DERIVADOS TRIAZÓIS

O método para a obtenção de derivados triazóis é similar ao procedimento descrito para a obtenção de 2-metilimidazóis. Assim, reagiu-se solução da betulina **I** (200 mg, 0,45 mmol) em THF anidro (8 mL) com CDT (295 mg, 1,8 mmol), a refluxo durante 8 h. O sólido amarelado resultante foi purificado em FCC, utilizando com éter de petróleo (40-60°C) / acetato de etilo (proporção de 3: 2) originando o derivado **12** (175 mg, 72%): p.f. (acetona / n-hexano) 200-203°C; IV (filme) M_{máx} 389, 3070, 1791, 1762, 1642, 882 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,83 (br s, 1H, H-5'), 8,09 (br s, 1H, H-3'), 4,74–4,72 (m, 2H, H-29_a e H-28_a), 4,63 (br s, 1H, H-29_b), 4,30 (d, J = 10,8 Hz, 1H, H-28_b), 3,19 (dd, J = 10,8 Hz, J = 5,2 Hz, 1H, H-3α), 2,49 (dt, J = 10,7 Hz, J = 6,0 Hz, 1H, H-19), 1,70 (s, 3H, H-30), 1,06 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 0,84 (s, 3H), 0,77 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 153,6 (C3'), 149,5 (C20), 147,9 (OCO), 145,4 (C5'), 110,3 (C29), 78,9 (C3), 68,4 (C28); EI-MS m/z (% intensidade rel.): 537 (4) M⁺, 190 (74), 189 (100), 187 (89), 133 (72), 119 (98), 107 (75), 105 (82), 91 (93), 79 (89).

3.2. ORIGEM E CULTURA DE *LEISHMANIA*

As culturas utilizadas foram promastigotas de *Leishmania infantum* Nicolle (zimodemo MON-1). Esta forma do parasita tem como vantagem ser de fácil cultivo *in vitro* em meios axênicos^[136]. Os promastigotas foram inoculados em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado com Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES) (25 mM) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado. As culturas foram mantidas a 26°C com passagens semanais adicionando-se meio fresco às células (4,5ml de meio a 0,5 ml de células). Antes das passagens e testes de suscetibilidade, as culturas são observadas ao microscópio invertido de forma a verificar a morfologia e mobilidade dos promastigotas.

3.3. ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através de métodos colorimétricos, uma vez que são práticos, sensíveis e de baixo custo^[137]. O teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um ensaio colorimétrico muito utilizado para avaliação da atividade anti-*Leishmania* de compostos químicos e produtos naturais. As desidrogenases mitocondriais reduzem o sal MTT, hidrossolúvel e de cor amarela, a formazana, um produto lipossolúvel de cor violeta que absorve a 530 nm. Uma vez que esta redução ocorre só em células viáveis, a quantidade de formazana é diretamente proporcional à quantidade de células vivas^[138].

Os compostos foram dissolvidos em DMSO, preparando-se soluções *stock* a 10 mM. Uma vez que o DMSO interfere com a viabilidade celular, torna-se um fator limitante da concentração máxima de composto a testar. Desta forma, foram realizados, paralelamente aos ensaios com os derivados, controlos do veículo de dissolução com concentrações de DMSO iguais às presentes nos ensaios com os compostos.

Os promastigotas de *L. infantum* em fase de crescimento logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubados, em placas de cultura de 96 poços, com concentrações crescentes dos compostos (10 a 200 µM) em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25mM) enriquecido com 10% SBF inativado durante 24 horas, a 26°C. Os ensaios controlo foram efetuados ao mesmo tempo e nas mesmas condições na presença e ausência do solvente usado na dissolução dos derivados (DMSO).

Posteriormente, foi adicionado a cada poço 25 µl de uma solução de MTT (5 mg.ml⁻¹) e as placas foram incubadas a 37° C durante 2 horas. Após o período de incubação, efetuou-se uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, os sobrenadantes foram aspirados e as células lavadas duas vezes com tampão PBS. Os cristais de formazana foram dissolvidos em 250 µl de DMSO e a absorvância lida a 530 nm num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK). Todas as experiências foram realizadas em triplicado e, pelo menos, em três ensaios independentes.

A viabilidade celular foi determinada através da fórmula $[(L1/L2) \times 100]$ em que L1 é a absorvância das células na presença de determinada concentração do composto e L2 a absorvância das células controlo, Os resultados foram, assim, expressos em percentagem de absorvância relativamente ao controlo. A concentração que inibe a viabilidade dos promastigotas de *Leishmania* a 50% (CI₅₀) foi determinada através de regressão dose-resposta, extrapolada pelo programa GraphPad Prism 6.

3.4. ESTUDO MORFOLÓGICO POR MICROSCOPIA ÓTICA

Através de microscopia de contraste de fase foram analisados os efeitos dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos (CI₅₀ mais baixos). Os promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubados com as concentrações CI₅₀, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) suplementado com 10% SBF inativado, a 26°C durante 6 e 24 horas. Como controlo realizaram-se ensaios sob as mesmas condições, substituindo o composto por DMSO em concentração igual à dos ensaios com os compostos. Posteriormente, a cada período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sedimento obtido foi ressuspenso em meio de forma a suspensão ficar homogénea. Seguidamente, retirou-se 10 µl suspensão celular e colocou-se numa lâmina de Koch, observando-se diretamente no microscópio ótico de contraste de fases (Eclipse E400, Nikon acoplado com câmara digital, 165 DN100 Nikon).

3.5. ESTUDOS DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de citometria de fluxo é uma técnica baseada na medição da dispersão de luz e da fluorescência de um fluxo linear de células^[139]. As aplicações mais comuns desta técnica são a medição da quantidade de ADN celular e a análise do ciclo celular^[140]. As células são marcadas com um corante que se liga ao ADN, normalmente o iodeto de propídio (IP), que quando

excitado a 488 nm emite fluorescência vermelha^[141]. O princípio da técnica é baseado na incorporação nas células de uma quantidade de corante proporcional à quantidade de ADN e, conseqüentemente, o sinal fluorescente emitido pelas células é proporcional ao teor de ADN celular ligado ao corante. A citometria de fluxo também permite a identificação da distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular^[140]. Assim, através da fluorescência pode-se identificar a fase G0/G1 (fluorescência menor), a fase S (fluorescência intermédia) e a fase de G2/M (dobro da fluorescência da fase G0/G1). 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^[142].

Os promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubados com concentrações de CI₅₀ dos compostos mais ativos, em meio RPMI 1640 tamponado com HEPES (25 mM) suplementado com 10% SBF inativado, a 26°C, durante 24 horas. Os controlos do veículo de dissolução realizaram-se sob as mesmas condições dos ensaios, porém sem compostos e na presença de DMSO em concentrações iguais às presentes nos ensaios com os compostos. Um controlo do ciclo celular foi realizado contendo apenas os promastigotas e o meio de crescimento. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e o sedimento foi permeabilizado e fixado com 200 µl de etanol a 70% durante 30 minutos a 4°C. Seguidamente, procedeu-se à lavagem com PBS (suplementado com 2% de BSA) e adicionou-se 500 µl de solução de IP (PI/RNase, Immunostep) deixando-se atuar durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por último procedeu-se à análise no citómetro de fluxo (FacsCalibur). Os resultados foram analisados no programa ModFit LT V 2.0.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE ANTI-LEISHANIA DOS DERIVADOS DA BETULINA

O efeito dos derivados da betulina (**11 a 21**, **23** e **24**) e do ácido betulínico (**25 a 31**) na viabilidade dos promastigotas de *L. infantum* foi analisado recorrendo ao teste de MTT. Os promastigotas de *L. infantum* em fase de crescimento logarítmica (2×10^6 células.mL⁻¹) foram incubados, em placas de cultura de 96 poços, com concentrações crescentes dos compostos (10 a 200 µM) em meio RPMI 1640 durante 24 horas, a 26°C. Seguidamente, os promastigotas foram incubados com MTT durante duas horas, sendo então determinada a respetiva absorvência a 530nm. Os resultados foram expressos em percentagem de promastigotas viáveis relativamente ao controlo.

A redução da viabilidade celular foi observada na presença de todos os derivados da betulina (Figura 23) e do ácido betulínico (Figura 24), verificando-se que a suscetibilidade dos promastigotas está diretamente relacionada com a concentração utilizada do derivado.

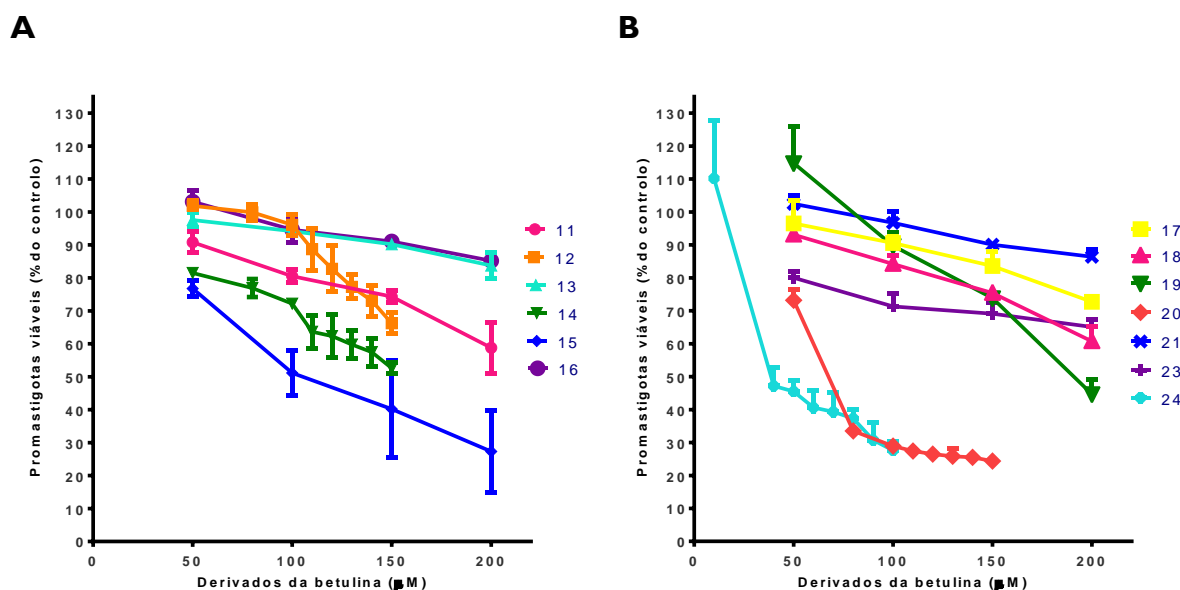


Figura 23 - Efeito dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*. As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.mL⁻¹) foram incubadas por 24 horas na presença de concentrações crescentes dos derivados da betulina. (A) **11 a 16**; (B) **17 a 21**, **23** e **24**. Os valores médios e os erros padrão da média foram calculados a partir de três experiências independentes.

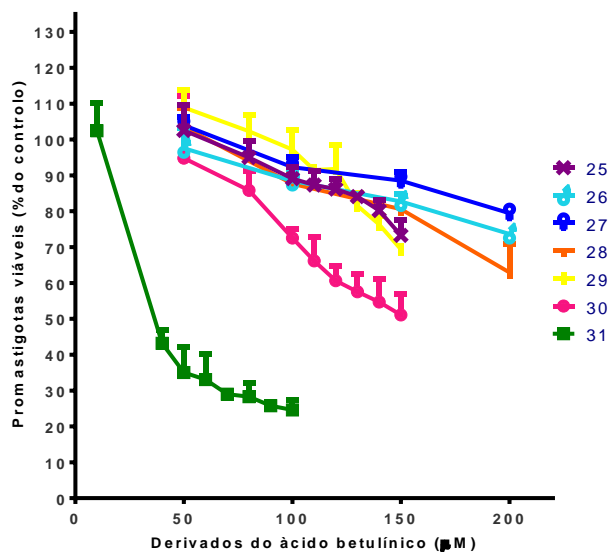


Figura 24 - Efeito dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*. As culturas de promastigotas em fase logarítmica (2×10^6 células.ml⁻¹) foram incubadas por 24 horas na presença de concentrações crescentes dos derivados do ácido betulínico, **25** a **31**. Os valores médios e os erros padrão da média foram calculados a partir de três experiências independentes.

Através da análise das figuras 23 e 24 verifica-se que os efeitos na redução da viabilidade celular não são similares entre os diversos compostos, indicando, assim, que a atividade leishmanicida dos derivados betulínicos é influenciada pela estrutura química do derivado. Os compostos mais ativos, ou seja, os que induziram a maior redução na viabilidade dos promastigotas sob menor concentração, foram os derivados **24** (Figura 23B) e **31** (Figura 24).

4.2.DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE CI₅₀

O valor de CI₅₀ representa a concentração de derivado que inibe 50% a viabilidade dos promastigotas de *L. infantum*. Estes valores de CI₅₀ foram calculados a partir das curvas dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 6 (Tabelas IV e V). Através dos valores de CI₅₀ obtidos realizou-se um estudo comparativo da suscetibilidade de *Leishmania* aos diferentes derivados da betulina e do ácido betulínico. Nas concentrações testadas (10- 200 μM) foi possível obter valores de CI₅₀ para nove derivados da betulina e do ácido betulínico (Tabelas IV e V), uma vez que apresentaram valores de inibição da viabilidade superiores a 50%. Para os restantes derivados, cuja concentração máxima testada não inibiram a viabilidade a 50%, os valores de CI₅₀ são apresentados como >200 μM.

A betulina apresentou reduzida atividade contra a espécie *L. infantum* ($CI_{50} = 192,4 \mu\text{M}$) (Tabela IV). Num estudo anterior, em espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, verificou-se igualmente uma atividade limitada da betulina ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$) [131].

Dos 13 derivados da betulina testados, seis apresentaram atividade leishmanicida: três compostos com atividade superior à betulina (**15**, **20** e **24**), destacando-se a atividade promissora do derivado **24** ($CI_{50} = 48,68 \mu\text{M}$); três derivados apresentaram atividade similar à da betulina (**12**, **14** e **19**); e os restantes derivados (**11**, **13**, **16**, **17**, **18**, **21** e **23**) com uma atividade inferior à betulina ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$) (Tabela V).

Tabela IV - Concentração inibitória a 50% (CI_{50}) dos derivados da betulina na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*.

Derivados da betulina	$CI_{50} \mu\text{M}$ (IC)*	R^2
Betulina	192,4 (178,8-207,0)	0,8575
11	> 200	-
12	170,3 (160,1-181,2)	0,8995
13	> 200	-
14	171,7 (155,1-190,0)	0,8497
15	108,1 (89,87-130,0)	0,8178
16	> 200	-
17	> 200	-
18	> 200	-
19	190,5 (170,5-212,8)	0,8690
20	69,71 (62,07-78,29)	0,8664
21	> 200	-
23	> 200	-
24	48,68 (45,19-52,45)	0,9280

*IC, intervalos de confiança a 95%

O ácido betulínico apresentou moderada atividade contra a espécie *L. infantum* ($CI_{50} = 87,94 \mu\text{M}$) (Tabela V). Esta atividade é bastante similar à obtida no estudo de Takahashi e colaboradores [130] com *L. major* (CI_{50} de $88 \mu\text{M}$), diferindo do estudo de Domínguez-Carmona e colaboradores [131] onde não foi reportada atividade nas espécies *L. amazonensis* e *L. brasiliense* ($CI_{50} > 200 \mu\text{M}$).

Entre os derivados do ácido betulínico testados, o derivado **31** foi mais ativo que o ácido betulínico e os restantes derivados (**25, 26, 27, 28, 29, 30**) apresentou menor atividade anti-*Leishmania* ($CI_{50} > 87,94 \mu M$).

Tabela V - Concentração inibitória a 50% (CI_{50}) dos derivados do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas de *Leishmania infantum*.

Derivados	$CI_{50} \mu M$ (IC)	R^2
Acido betulínico	87,94 (80,55-96,01)	0,8463
25	> 200	
26	> 200	
27	> 200	
28	> 200	.
29	170,1 (157,8-183,5)	0,8496
30	147,9 (136,6-160,1)	0,8225
31	37,54 (31,08-45,34)	0,9422

*IC, intervalos de confiança a 95%

Com o objetivo de sumariar os resultados de susceptibilidade obtidos, agruparam-se os derivados em diferentes classes consoante o valor de CI_{50} obtido (Tabela VI).

Entre os vinte derivados testados três compostos mostraram valores de CI_{50} mais promissores ($CI_{50} < 100 \mu M$), destacando-se a atividade dos derivados **24** e **31**. O derivado **20** apresentou uma atividade leishmanicida similar à atividade do ácido betulínico. Os restantes seis derivados (**12, 14, 15, 19, 29, 30**) apresentaram atividade moderada ($100 < CI_{50} > 200 \mu M$).

Tabela VI - Agrupamento dos derivados da betulina e do ácido betulínico segundo as concentrações inibitórias a 50 % (CI_{50}) em promastigotas de *Leishmania infantum*.

$CI_{50} \mu M$	Derivados da betulina	Derivados do ácido betulínico
$CI_{50} > 200$	11, 13, 16, 17, 18, 21, 23	25, 26, 27, 28
$200 < CI_{50} > 150$	Betulina, 12, 14, 19	29
$150 < CI_{50} > 100$	15	30
$100 < CI_{50} > 50$	20	Acido betulínico
$CI_{50} < 50$	24	31

4.3. RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

A similaridade estrutural entre os diversos derivados testados, permite fazer uma análise da relação entre a estrutura química do derivado e a atividade anti-*Leishmania*. Deste modo, a análise da relação estrutura/atividade dos derivados betulínicos pode fornecer orientações específicas para a síntese de novos derivados com potencial atividade leishmanicida superior.

4.3.1. DERIVADOS DA BETULINA

A estrutura química dos derivados da betulina permite analisar a influência da adição de grupos triazóis e 2-metilimidazóis na atividade anti-*Leishmania*. Através da comparação dos diversos derivados onde foram inseridos grupos triazóis (**12**, **14**, **15**, **17**, **19** e **24**) verifica-se a diminuição do valor de CI_{50} (exceção do composto **17**). Os derivados cuja modificação foi a adição do grupo 2-metilimidazole (**11**, **13**, **16**, **18**, **20**, **21** e **23**) conduziu ao aumento do valor de CI_{50} (compostos com $CI_{50} > 200\mu M$), sendo o composto **20** a única exceção. Ou seja, na maioria dos casos, a carbamoilação das posições C3 e/ou C28 com a inserção de grupos 1,2,4-triazole nessas posições resulta numa melhoria da atividade leishmanicida, enquanto as mesmas modificações realizadas com a adição de grupos 2-metilimidazole conduz à diminuição da atividade. Estes resultados indicam a importância do grupo triazole na atividade dos derivados da betulina. Um exemplo inequívoco da importância do grupo triazole é revelada através da comparação da atividade da betulina com os compostos **23** e **24**: valores de CI_{50} 192,4 μM , $> 200 \mu M$ e 48,68 μM , respetivamente. De fato, num estudo anterior já tinha sido reportado que a adição de anéis heterocíclicos triazóis no esqueleto lupano da betulina resultava no aumento das propriedades leishmanicida^[128].

O derivado **20** (CI_{50} de 69,71 μM) foi o único derivado com grupo 2-metilimidazole que apresentou um aumento da atividade leishmanicida (Figura 25). Este fato pode dever-se às modificações estruturais nos carbonos C20 e C29, onde o grupo isopropenil foi transformado num grupo isopropil ao qual se adicionou um grupo aldeído em C29. Sousa e colaboradores reportaram uma boa atividade anti-*Leishmania* (CI_{50} de 50,8 μM) com um composto de estrutura química semelhante (Figura 18 derivado **12**), sugerindo que as modificações em C20 tem um impacto positivo sobre a atividade anti-*Leishmania* dos derivados da betulina^[8].

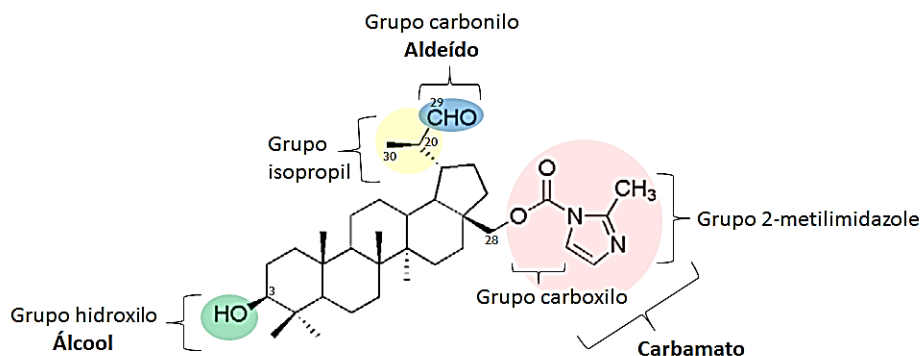


Figura 25 - Estrutura química do derivado da betulina **20** e identificação de grupos funcionais.

A similaridade entre as estruturas químicas dos compostos testados permite também comparar o efeito das modificações nos C20, C29 e C30, provocadas pela metoxilação da posição C29 (comparação entre **11** e **21**; **13** e **23**; **14** e **24**). Não é possível discutir a relação estrutura-atividade relativamente aos compostos **11**, **21** e **13**, **23** uma vez que não foi possível definir os valores de Cl_{50} nas concentrações testadas. No entanto, relativamente aos compostos **14** e **24**, verifica-se que a metoxilação da posição C29 do composto **14** (Cl_{50} de 171,7 μ M) conduziu ao derivado **24** (Cl_{50} de 50,8 μ M), o derivado da betulina mais ativo do presente trabalho (Figura 26). Este impacto positivo na atividade leishmanicida, possivelmente devido à metoxilação, é concordante com os resultados reportados por Sousa e colaboradores^[8].

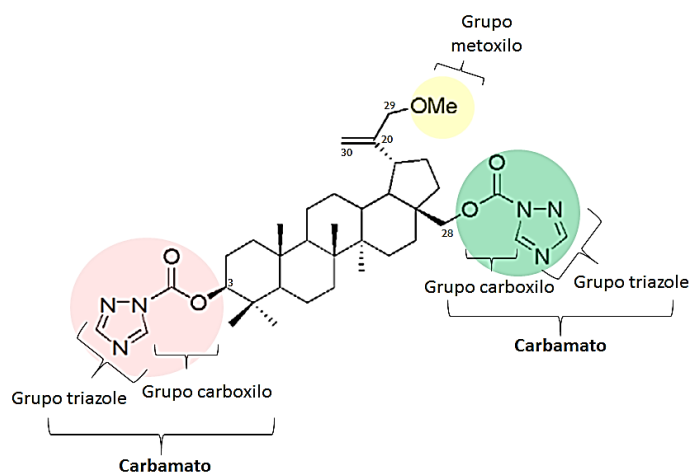


Figura 26 - Estrutura química do derivado da betulina **24** e identificação de grupos funcionais.

O derivado **17** (Cl_{50} superior a 200 μ M) foi o único derivado com o grupo triazole que diminuiu a atividade leishmanicida (Figura 27). A única diferença estrutural entre este composto e o derivado **15** (Cl_{50} de 108,1 μ M) é que no derivado **15** há a presença de um grupo hidroxilo em C3 e no composto **17** o grupo álcool foi acetilado. Verifica-se que existem

outros derivados com a mesma similaridade estrutural podendo-se fazer uma análise sobre o efeito da acetilação do grupo hidroxilo na atividade leishmanicida (**11** com o **18**; **12** com o **19**). Contudo, nos derivados **11** e **18** não é possível fazer essa análise uma vez que ambos apresentam valores de CI_{50} superiores a $200 \mu M$. No entanto, apesar da diminuição da atividade ser mais notória no composto **17**, a acetilação do grupo álcool, formando-se o derivado **19** (CI_{50} de $190,5 \mu M$), aparentemente conduziu a uma diminuição da atividade leishmanicida do derivado **12** (CI_{50} de $170,3 \mu M$). De fato, está reportado na literatura que a acetilação de grupos hidroxilo nas posições C3 e C28 retém a atividade anti-*Leishmania*^[119]. A atividade reduzida dos compostos **11**, **18** e **16** (CI_{50} superior a $200 \mu M$) pode dever-se tanto a presença do grupo 2-metilimidazole como à a acetilação dos respectivos grupos álcool.

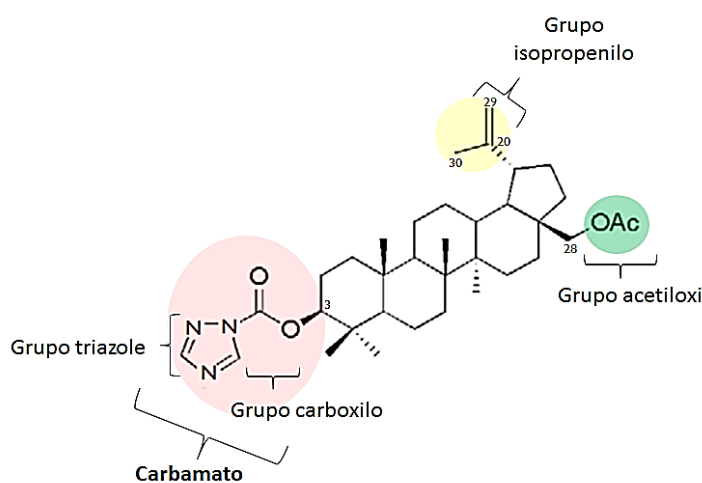


Figura 27 - Estrutura química do derivado da betulina **17** e identificação de grupos funcionais.

A estrutura química dos derivados permite ainda fazer uma análise da influência da posição de carbamoilação (C3, C28 ou em ambos) na atividade anti-*Leishmania* dos derivados. No entanto, devido a não definição de valores de CI_{50} (superior a $200 \mu M$) nos compostos 2-metilimidazóis, apenas se pode comparar o efeito das três alterações posicionais nos derivados triazóis **12**, **14** e **15**. Os compostos **12** e **14** apresentam atividades leishmanicidas bastante semelhantes (CI_{50} de $170,3 \mu M$ e $171,7 \mu M$, respetivamente), indicando que a atividade é análoga em compostos com carbamoilação na posição C28 e em ambas as posições C3 e C28. O derivado **15**, com carbamato na posição C3 apresentou um aumento na atividade anti-*Leishmania* (CI_{50} de $108,1 \mu M$). Contudo, comparando os compostos **17** com o **19**, onde a carbamoilação ocorreu no C3 e em C28, respetivamente, verifica-se que o composto com melhor atividade leishmanicida é o derivado **19**, não sendo possível auferir qualquer informação relativamente à importância da posição da carbamoilação. O aparente efeito

positivo na atividade leishmanicida de derivados com apenas um grupo carbamatos poderia indicar a importância da presença de um grupo hidroxilo no esqueleto lupano da betulina. No entanto, a elevada atividade do composto **24** e a similar atividade dos compostos **12** e **14**, afiguram-se como dados contraditórios.

4.3.2. DERIVADOS DO ÁCIDO BETULÍNICO

A similaridade estrutural entre os diversos derivados do ácido betulínico testados permite comparar a influência da formação de carbamatos em C3 e em C28. Relativamente ao derivado **25** verifica-se que a única modificação estrutural foi a formação de um carbamato imidazole em C3 (Figura 28). Esta carbamoilação induziu à diminuição da atividade anti-*Leishmania* ($CI_{50} > 200 \mu M$), podendo indicar que o grupo hidroxilo livre em C3 contribui para a atividade leishmanicida do ácido betulínico e/ou a adição do carbamato nessa posição piora a atividade antiparasitária. De fato, os restantes derivados carbamatos do ácido betulínico, tanto imidazóis (**26** e **28**) como triazóis (**28**), apresentaram valores de CI_{50} superiores a $200 \mu M$, reforçando a ideia que o grupo hidroxilo em C3 poderá estar relacionado com a atividade do ácido betulínico. Na literatura está reportado que a esterificação e eterificação dos grupos hidroxilos em C3 e C28, na maioria dos casos, retêm a atividade leishmanicida^[119].

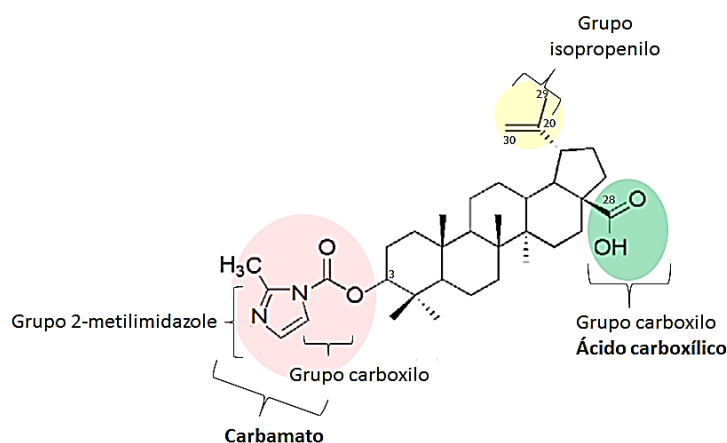


Figura 28 - Estrutura química do derivado da betulina **25** e identificação de grupos funcionais.

A diferença do potencial leishmanicida dos derivados **26** ($CI_{50} > 200 \mu M$) e **29** (CI_{50} de $170,1 \mu M$) pode ser explicada devido à inserção do grupo carbonilo em C3 (Figura 29). Isto significa que a oxidação do grupo álcool secundário em C3, formando-se uma cetona, deverá ser mais eficaz do que a formação de carbamatos. Num estudo de Alakurtti e colaboradores foi reportado que a oxidação da betulina incrementa a atividade anti-*Leishmania*^[119].

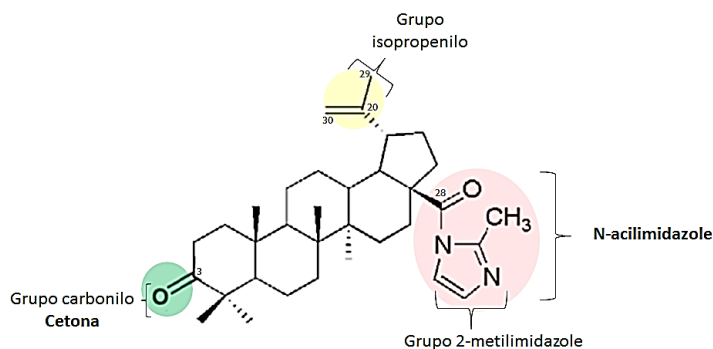


Figura 29 - Estrutura química do derivado da betulina **29** e identificação de grupos funcionais.

A comparação dos valores de CI_{50} dos derivados **29** ($170,1 \mu M$) e **30** ($147,9 \mu M$) permite analisar o impacto da ligação dupla entre C1 e C2 na atividade anti-*Leishmania*: a desidrogenação das posições C1 e C2 tem um ligeiro impacto positivo no potencial leishmanicida.

O único derivado do ácido betulínico mais ativo que o próprio ácido foi o derivado **31** (CI_{50} de $37,54 \mu M$) (Figura 30). Comparativamente com o ácido betulínico, verifica-se também a presença do grupo carboxilo em C28, sendo as modificações estruturais realizadas nas posições C1, C2 e C3. O álcool secundário presente em C3 foi oxidado, formando-se um grupo carbonilo. Relativamente às modificações em C1 e C2, verifica-se que juntamente com a desidrogenação de C1 e C2 foi inserido um grupo imidazole em C1. Sousa e colaboradores reportaram um composto com uma estrutura química bastante similar (Figura 18, derivado 14) e com elevada atividade anti-*Leishmania* [8].

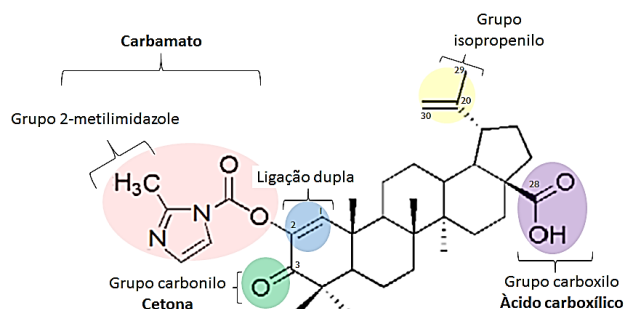


Figura 30 - Estrutura química do derivado da betulina **31** e identificação de grupos funcionais.

4.4. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM MICROSCOPIA ÓTICA

O efeito dos derivados da betulina e do ácido betulínico mais ativos (**24** e **31**) na morfológicas em promastigotas de *L. infantum* foi avaliado por observação em microscopia

ótica de contraste de fases. Este estudo permite visualizar a forma, tamanho, refringência e mobilidade dos promastigotas de *Leishmania*.

Após 6 horas, as células controlo de promastigotas de *L. infantum* apresentavam o seu aspeto fusiforme característico, com flagelo bem visível na região anterior das células e com mobilidade típica destes protozoários (Figura 31 A e B). O derivado **24** não induziu alterações morfológicas significativas nos promastigotas de *L. infantum* em microscopia de contraste de fase (Figura 31 C e D). Às 6 horas de incubação, o derivado **31** induziu uma ligeira diminuição da mobilidade celular e o aparecimento de alguns promastigotas ligeiramente arredondados. (Figura 31 E e F).

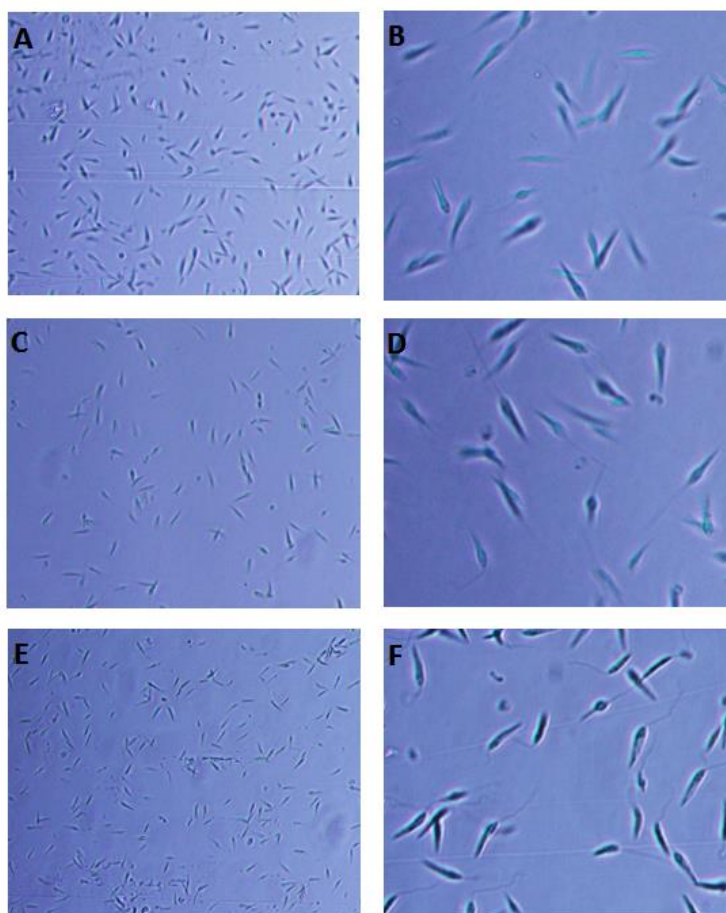


Figura 31 - Observação por microscopia ótica em contraste de fase dos promastigotas de *Leishmania infantum* na ausência e presença dos derivados **24** e **31**, após incubação a 26°C durante 6 horas. Preparação a fresco em contraste de fases, células controlo incubadas com DMSO: ampliação 100x (A), ampliação 200x (B). Células expostas ao derivado da betulina **24**: ampliação 100x (C), ampliação 200x (D). Células expostas ao derivado do ácido betulínico **31**: ampliação 100x (E), ampliação 200x (F).

Após 24 horas, as células controlo apresentaram-se móveis e com forma fusiforme típica, verificando-se o aumento no número de células (Figura 32 G e H). O derivado **24** não induziu alterações morfológicas significativas nos promastigotas de *L. infantum* em microscopia de

contraste de fase (Figura 32 I e J). Contudo, verificou-se um ligeiro aumento no número de células arredondadas. O derivado **3I** induziu uma acentuada diminuição da mobilidade celular, apresentando-se os promastigotas praticamente imóveis. Este derivado conduziu também a alterações morfológicas, nomeadamente ao aparecimento de promastigotas arredondados, mais pequenos e com flagelos mais curtos (Figura 32 K e L). Estes efeitos sugerem que os mecanismos induzidos pelo derivado **3I** em *L. infantum* poderão estar relacionados com alterações na organização e funções do citoesqueleto, permeabilização da membrana mitocondrial e/ou na atividade bioenergética da mitocôndria.

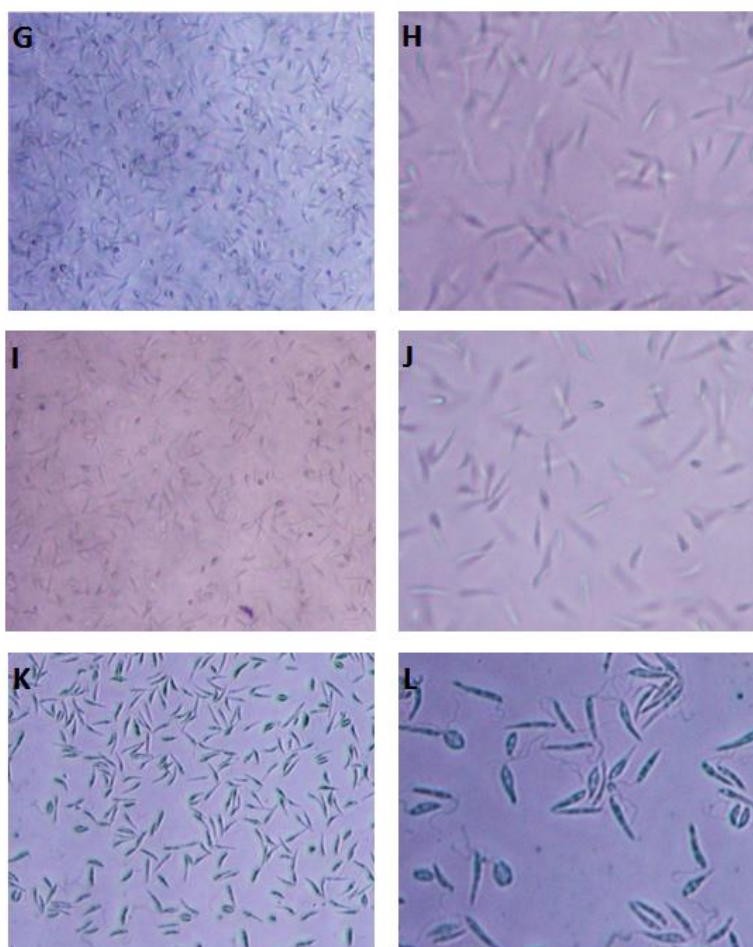


Figura 32 - Observação por microscopia ótica em contraste de fase dos promastigotas de *Leishmania infantum* na ausência e presença dos derivados **24** e **3I**, após incubação a 26°C durante 24 horas. Preparação a fresco em contraste de fases, células controlo incubadas com DMSO: ampliação 100x (G), ampliação 200x (H). Células expostas ao derivado da betulina **24**: ampliação 100x (I), ampliação 200x (J). Células expostas ao derivado do ácido betulínico **3I**: ampliação 100x (K), ampliação 200x (L).

A mitocôndria é um organelo essencial para a geração de energia celular, consequentemente, qualquer dano ou disfunção mitocondrial induz a morte celular

programada ou necrose. A síntese de ATP ocorre através da fosforilação oxidativa do ADP que utiliza como fonte de energia o gradiente de prótons gerado pela respiração mitocondrial. Deste modo, fatores que alterem o sistema de transporte de elétrons e o sistema fosforilativo constituem mecanismos responsáveis pela diminuição da eficiência energética das mitocôndrias e, conseqüentemente, por um abaixamento dos níveis de ATP, essencial à viabilidade celular^[85].

A diminuição da mobilidade dos promastigotas de *L. infantum* quando expostos ao derivado **31** pode estar relacionada com diminuição da atividade bioenergética do parasita.

O ácido betulínico induz a apoptose celular, através de um efeito direto sobre as mitocôndrias. Este ácido permeabiliza a membrana mitocondrial facilitando a libertação do citocromo c e do factor indutor da apoptose^[146, 147]. Estes acontecimentos mitocondriais desencadeiam uma cascata apoptótica sequencial, incluindo a ativação de caspases e fragmentação de ADN^[146].

Na literatura estão reportados diversos derivados heterocíclicos da betulina que induzem a inibição da proliferação celular através de alterações na polarização e estrutura da membrana mitocondrial^[148]. As alterações estruturais induzem um aumento da permeabilidade mitocondrial a solutos de baixa massa molecular, conduzindo a alterações do gradiente de prótons, essencial para a manutenção dos níveis de ATP necessários à viabilidade celular^[149]. Previamente foi demonstrado que a betulina induz a acumulação de ROS aumentando o stress celular em *Leishmania* devido à inibição da tripanotona sintetase. Esta é uma enzima responsável pela síntese de tripanotona, uma das enzimas chave de metabolismo redox do parasita. O aumento do stress oxidativo conduz à despolarização do potencial da membrana mitocondrial que ativa proteases com um papel importante no processo de apoptose em *Leishmania*^[85].

Uma vez que o composto **31** é um derivado da betulina, seria importante realizar estudos posteriores para determinar os efeitos do composto nos níveis de ROS, na permeabilidade mitocondrial e no potencial de membrana das mitocôndrias em promastigotas de *L. infantum*.

Os principais constituintes do citoesqueleto de tripanossomatídeos são os microtúbulos subpeliculares, localizados imediatamente abaixo da membrana celular. Os microtúbulos estão distribuídos por todo o corpo protozoário (com a exceção de o bolsa flagelar) e são interligados entre si através de filamentos^[150]. As alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. infantum* na presença dos derivados **24** e **31** poderão estar relacionadas com alterações nas fases de diferenciação celular e de citocinese.

Nas espécies de *Leishmania*, o ergosterol é um dos principais esteróis membranares e é diferente do esteroide dos mamíferos (colesterol), por conseguinte tem sido utilizado como alvo terapêutico. Diversos fármacos aprovados para o tratamento das leishmanioses apresentam mecanismos de ação relacionados com a inibição da biossíntese do ergosterol (azoles) e com a ligação ao ergosterol formando poros na membrana (anfotericina e as suas formulações lipídicas). Na literatura está reportado que o mecanismo dos triazóis está relacionado com a inibição de diversas enzimas essenciais à biossíntese do ergosterol, nomeadamente a inibição da esteroide 14 α -desmetilase [88, 150].

Os derivados **24** e **31** apresentam na sua estrutura dois grupos azoles sendo possível que um dos mecanismos de ação esteja relacionado com a inibição da biossíntese de ergosterol, conduzindo a alterações na membrana plasmática. Essas alterações podem provocar alterações na permeabilidade da membrana e consequentemente induzir a morte celular. Deste modo, no futuro deverão ser realizados estudos posteriores para avaliar a capacidade inibitória da síntese de ergosterol de ambos os derivados.

4.5.EFEITOS NO CICLO CELULAR DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM*

A avaliação do ciclo celular foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Esta técnica permite analisar a distribuição dos promastigotas de *L. infantum* nas diversas fases do ciclo celular: fase G0/G1, S e na fase de G2/M. 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 (Figura 33).

O ciclo celular foi realizado em triplicado obtendo-se os resultados representados na Tabela VII.

Durante o tempo de incubação (24 horas) os promastigotas expostos aos derivados **24** e **31** distribuem-se pelas diferentes fases do ciclo celular de forma semelhante aos respetivos controlos. Em geral, ambos os compostos diminuíram ligeiramente o número de células em fase G0/G1 e aumentaram a população celular em S e em G2/M.

Analisando a média dos resultados obtidos nos diferentes ensaios (Tabela VII) verifica-se que o derivado 24 induziu um ligeiro aumento de cerca de 4,64% no número de células na fase S (de 22,51% para 27,15%). No mesmo período, a percentagem das promastigotas nas fases G0/G1 diminuiu 5,65%. Consequentemente, a diferença no número de células em G2/M é pequena, com um ligeiro aumento (1,07%). Apesar de os valores diferenciais entre as diferentes fases do ciclo celular, verifica-se que em todos os ensaios o derivado da betulina

induziu a diminuição populacional em G0/G1, aumentando em S e G2/M, com o aumento mais significativo em S.

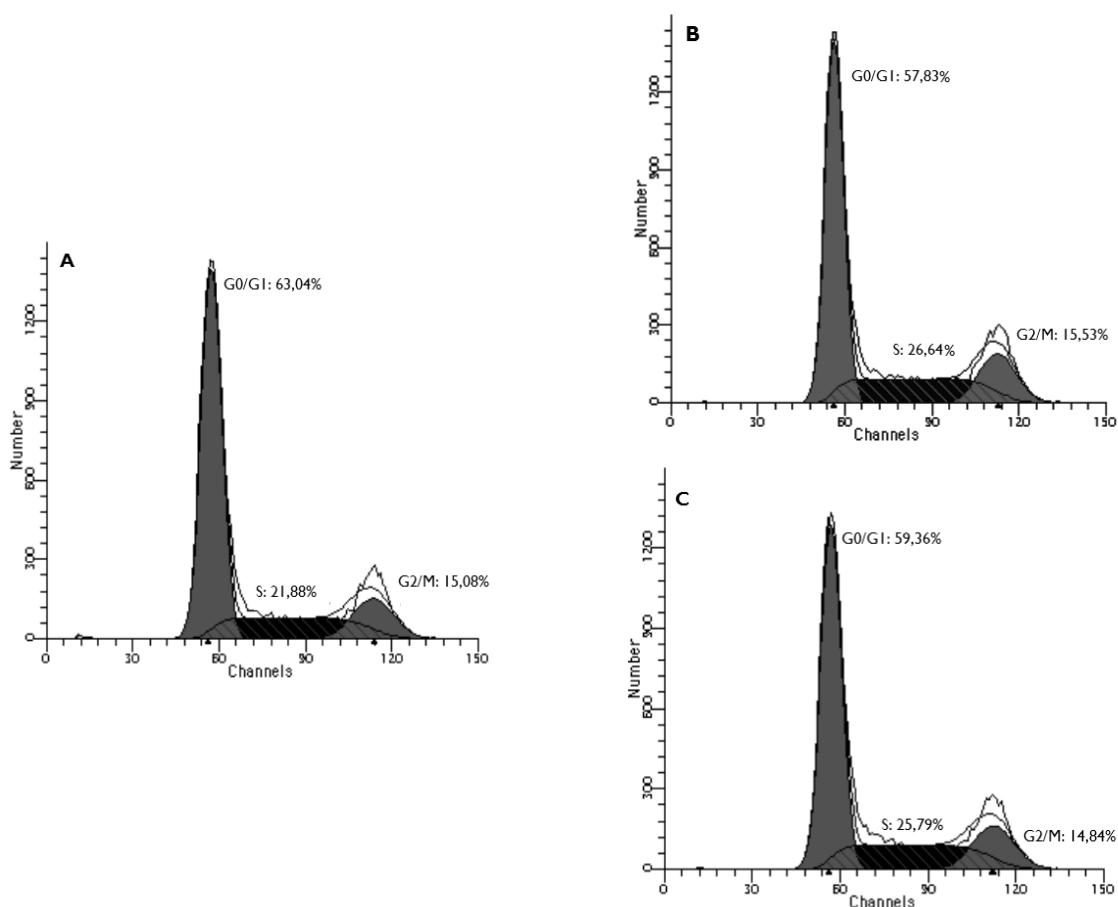


Figura 33 - Histogramas representativos do conteúdo de ADN dos promastigotas de *Leishmania infantum* expostas aos derivados da betulina (**24**) e do ácido betulínico (**31**). Os promastigotas foram incubadas durante 24h na ausência ou presença dos derivados nas concentrações CI_{50} . As células foram marcadas com IP e analisadas por citometria de fluxo. (A) controlo; (B) **24**; (C) **31**.

Tabela VII - Efeitos dos derivados **24** e **31**, nas concentrações CI_{50} , no ciclo celular de *Leishmania infantum*.

Ensaio	Controlo (% do total de células)			Derivado 24 (% do total de células)			Derivado 31 (% do total de células)		
	G0/G1	S	G2	G0/G1	S	G2	G0/G1	S	G2
1	62,19	23,37	14,44	54,95	29,02	16,03	51,76	28,82	19,42
2	63,04	21,88	15,08	57,83	26,64	15,53	59,36	25,79	14,84
3	63,85	22,28	13,67	59,36	25,79	14,84	60,89	23,04	16,07
Média	63,03	22,51	14,40	57,38	27,15	15,47	57,26	25,11	17,63

Em relação ao derivado **31**, a médias dos resultados dos três ensaios revela um efeito similar ao composto **24**. O número de células em G0/G1 sofreu uma ligeira diminuição de 5,77% (63,03% para 57,38%). O número de células nas fases S e G2/M aumentou, 2,6% e 3,23%, respetivamente. Apesar da influência do composto **31** no número de promastigotas em cada fase do ciclo celular não ser constante, verifica-se que em praticamente todos os ensaios o derivado da betulina induziu a diminuição populacional em G0/G1, aumentando em S e G2/M.

Os resultados parecem indicar que os compostos não influenciam significativamente o ciclo celular da *Leishmania*, não sendo a inibição da proliferação dos promastigotas de *L. infantum* o principal mecanismo de atividade dos derivados betulínicos testados.

Diversos estudos apontam as topoisomerases de ADN como um alvo celular dos derivados betulínicos. Estas enzimas são responsáveis pela remoção do *stress* torsional da molécula de ADN através da quebra e ligação de uma (topoisomerases tipo I) ou de ambas as cadeias (topoisomerases tipo II) ^[145]. A betulina é um agente anticancerígeno que induz a apoptose em células cancerosas humanas através da via apoptótica intrínseca. A betulina e os derivados da betulina inibem as topoisomerases ^[85, 120, 129]. Contudo, o estudo realizado por Santos e colaboradores demonstrou que os melhores inibidores da proliferação das células cancerígenas não eram os melhores inibidores da topoisomerase, sugerindo a existência de diversos mecanismos responsáveis pela atividade citostática dos derivados betulínicos ^[144, 146]. De forma análoga também parece não existir uma correlação entre a maior atividade inibitória da topoisomerase com a maior atividade anti-*Leishmania*.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o efeito dos 20 derivados da betulina e do ácido betulínico na viabilidade das promastigotas, permitindo identificar os derivados com maior atividade anti-*Leishmania*, o derivado da betulina **24** ((1H-triazole-1-il)-carboxilato de 30-metoxi-lup-20(29)-en-3 β ,28-di-ilo) e o derivado do ácido betulínico **31** (Ácido 2-(2'-metil-1H-imidazole-1-carboxiloxi)-3-oxo-lup-1,20(29)-dien-28-óico).

A análise da relação estrutura-atividade permitiu verificar que a formação de carbamatos imidazóis em C3 e/ou C28 diminuiu a atividade anti-*Leishmania* dos derivados da betulina. Pelo contrário, a formação de carbamatos triazóis, nas mesmas posições, aumentou o potencial leishmanicida dos derivados da betulina, conduzindo a um dos derivados com melhor atividade, o **24**. Os resultados obtidos sugeriram que as modificações em C20 e C29 têm um impacto positivo na atividade anti-*Leishmania* dos derivados da betulina e que a acetilação das posições C3 e/ou C28 diminui a atividade dos derivados.

Nos derivados do ácido betulínico confirmou-se que o ácido betulínico possui uma moderada atividade leishmanicida e verificou-se que a carbamoilação das posições C3 e C28 diminui a atividade leishmanicida do ácido betulínico e que a oxidação do grupo hidroxilo em C3 aumenta a atividade. Neste trabalho, o derivado do ácido betulínico com melhor atividade leishmanicida foi o **31**.

Os derivados **24** e **31**, quando incubados com promastigotas de *L. infantum* nas respectivas concentrações CI_{50} , não produziu alterações significativas no ciclo celular. Deste modo, o mecanismo de ação principal destes derivados não deverá estar relacionado com inibição da proliferação celular.

A microscopia de contraste de fase indicou que o derivado **31** diminui a mobilidade dos promastigotas *L. infantum*. Desta forma, o mecanismo de ação deste derivado deve estar relacionado com uma diminuição da atividade mitocondrial que conduziu a um decréscimo da atividade bioenergética do parasita.

Este trabalho permitiu determinar modificações estruturais que conduzem ao aumento da atividade anti-*Leishmania* da betulina e do ácido betulínico. A aplicação destes resultados no *design* de novos derivados, deverá conduzir a derivados mais eficazes, representando moléculas promissoras a aplicar no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas da leishmaniose.

CAPÍTULO VI

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cecilio, P., et al., *Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 480.
2. Stuart, K., et al., *Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1301-10.
3. Patterson, S. and S. Wyllie, *Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects*. Trends Parasitol, 2014. **30**(6): p. 289-98.
4. WHO, *Control of the leishmaniases*. World Health Organization technical report series, (**949**), xii-xiii, 1-186. 2010.
5. Chappuis, F., et al., *Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(11): p. 873-82.
6. Amato, V.S., et al., *Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study*. Int J Infect Dis, 2000. **4**(3): p. 153-7.
7. Boite, M.C., et al., *New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of Leishmania (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(11): p. e1888.
8. Sousa, M.C., et al., *Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e89939.
9. Ross, R., *Further notes on Leishman's bodies*. Br Med J, 1903. **2**(2239): p. 1401.
10. Pratlong, F., et al., *Geographical distribution and epidemiological features of Old World Leishmania infantum and Leishmania donovani foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains*. Parasitology, 2013. **140**(4): p. 423-34.
11. Campino, L. and P. Abranches, *[Cutaneous leishmaniasis. Unusual disease in Portugal?]*. Acta Med Port, 2002. **15**(5): p. 387-90.
12. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. **64**: p. 1-109.
13. Chacara, D., et al., *Evolutionary history of Leishmania killicki (synonymous Leishmania tropica) and taxonomic implications*. Parasit Vectors, 2015. **8**(1): p. 198.

14. Croan, D.G., D.A. Morrison, and J.T. Ellis, *Evolution of the genus Leishmania revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences*. Mol Biochem Parasitol, 1997. **89**(2): p. 149-59.
15. Marcili, A., et al., *Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America*. Infect Genet Evol, 2014. **25**: p. 44-51.
16. Moreira, D., P. Lopez-Garcia, and K. Vickerman, *An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 5): p. 1861-75.
17. Lukes, J., et al., *Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates*. Mol Biochem Parasitol, 2014. **195**(2): p. 115-22.
18. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. Int J Parasitol, 2003. **33**(10): p. 1027-34.
19. Lainson, R., *The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy*. Rev Pan-Amaz Saude, **1**, 13–38. , 2010.
20. Sadlova, J., et al., *Visualisation of Leishmania donovani Fluorescent Hybrids during Early Stage Development in the Sand Fly Vector*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19851.
21. Lukes, J., et al., *Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9375-80.
22. Gramiccia, M. and L. Gradoni, *The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control*. Int J Parasitol, 2005. **35**(11-12): p. 1169-80.
23. Hernandez, C., et al., *Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay*. Parasit Vectors, 2014. **7**: p. 501.
24. Cortes, S., et al., *Genetic diversity evaluation on Portuguese Leishmania infantum strains by multilocus microsatellite typing*. Infect Genet Evol, 2014. **26**: p. 20-31.
25. Shaw, J.J., *Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1994. **89**(3): p. 471-8.
26. Aluru, S., et al., *Multilocus microsatellite typing of Leishmania and clinical applications: a review*. Parasite, 2015. **22**: p. 16.
27. Campino, L., et al., *Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of Leishmania infantum based on the identification of 213 strains*. Trop Med Int Health, 2006. **11**(11): p. 1708-14.

28. Besteiro, S., et al., *Protein turnover and differentiation in Leishmania*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1063-75.
29. Wheeler, R.J., E. Gluenz, and K. Gull, *The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology*. Mol Microbiol, 2011. **79**(3): p. 647-62.
30. Garnham, P.C., *The genus Leishmania*. Bull World Health Organ, 1971. **44**(4): p. 477-89.
31. Dawit, G., Z. Girma, and K. Simenew, *A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis*. J Bacteriol Parasitol, 2013. **4**: 166.
32. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1097-106.
33. Kato, H., et al., *Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis* Int J Environ Res Public Health, 2010. **7**(3): p. 814-26.
34. Young, D.G. and M.A. Duncan, *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae)*. ed. M.A.E. Inst. Vol. 54. 1994, Gainesville: Associated Publishers. 1-881.
35. Thies, S.F., et al., *Phlebotomine sandfly fauna and natural Leishmania infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil*. Rev Soc Bras Med Trop, 2013. **46**(3): p. 293-8.
36. Souza, T.L., et al., *Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil*. Acta Trop, 2014. **136**: p. 104-7. 2014.
37. Singh, S., A. Dey, and R. Sivakumar, *Applications of molecular methods for Leishmania control*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(2): p. 251-65.
38. Ramalho-Ortigao, M., E.M. Saraiva, and Y.M. Traub-Cseko, *Sand fly- interactions: long relationships are not necessarily easy*. Open Parasitol J, 2010. **4**: p. 195-204.
39. Ready, *Epidemiology of visceral leishmaniasis*. Clin Epidemiol, 2014. **6**: p. 147-54.
40. Sharma, U. and S. Singh, *Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control*. J Vector Borne Dis, 2008. **45**(4): p. 255-72.
41. Campino, L. and C. Maia, *[Epidemiology of leishmaniasis in Portugal]*. Acta Med Port, 2010. **23**(5): p. 859-64.
42. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 305-18.
43. Amora, S.S., et al., *Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) Leishmaniasis Vectors*. Neotrop Entomol, 2009. **38**(3): p. 303-10.

44. Dedet, J.P., *Leishmania et leishmanioses du continent américain*. Annales de l'Institut Pasteur. Actualités, 1993. **4**(1): p. 3-25.
45. Patz, J.A., et al., *Effects of environmental change on emerging parasitic diseases*. Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1395-405.
46. Lainson, R. and E.F. Rangel, *Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100**(8): p. 811-27.
47. Desjeux, P., *Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis*. Med Microbiol Immunol, 2001. **190**(1-2): p. 77-9.
48. Roque, A.L. and A.M. Jansen, *Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas*. Int J Parasitol Parasites Wildl, 2014. **3**(3): p. 251-62.
49. Ashford, R.W., *Leishmaniasis reservoirs and their significance in control*. Clin Dermatol, 1996. **14**(5): p. 523-32.
50. Desjeux, P. and J. Alvar, *Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe*. Ann Trop Med Parasitol, 2003. **97** Suppl 1: p. 3-15.
51. Kumar, R. and C. Engwerda, *Vaccines to prevent leishmaniasis*. Clin Transl Immunology, 2014. **3**(3): p. e13.
52. Ready, P.D., *Leishmaniasis emergence in Europe*. Euro Surveill, 2010. **15**(10): p. 19505.
53. Quinnell, R.J. and O. Courtenay, *Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis*. Parasitology, 2009. **136**(14): p. 1915-34.
54. Walker, D.M., et al., *Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(7): p. 1245-63.
55. Alexander, J., A.R. Satoskar, and D.G. Russell, *Leishmania species: models of intracellular parasitism*. J Cell Sci, 1999. **112** Pt 18: p. 2993-3002.
56. Charest, H. and G. Matlashewski, *Developmental Gene Expression in Leishmania donovani: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage-Specific Gene*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(5): p. 2975-84.
57. Mauel, *Macrophage-Parasite Interactions in Leishmania Infections*. J Leukoc Biol, 1990. **47**(2): p. 187-93.
58. Wilson, R., et al., *Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(9).
59. Dostalova, A. and P. Volf, *Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview*. Parasit Vectors, 2012. **5**: p. 276.

60. Kamhawi, S., *Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?* Trends Parasitol, 2006. **22**(9): p. 439-45.
61. Soares, R.P., et al., *Differential midgut attachment of Leishmania (Viannia) braziliensis in the sand flies Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani and Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia.* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 439174.
62. Myskova, J., et al., *A lipophosphoglycan-independent development of Leishmania in permissive sand flies.* Microbes Infect, 2007. **9**(3): p. 317-24.
63. Rogers, M.E. and P.A. Bates, *Leishmania Manipulation of Sand Fly Feeding Behavior Results in Enhanced Transmission.* PLoS Pathog, 2007. **3**(6): p. e91.
64. Rogers, M.E., *The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host.* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 223.
65. Bogdan, C. and M. Rollinghoff, *How do protozoan parasites survive inside macrophages?* Parasitol Today, 1999. **15**(1): p. 22-8.
66. McGwire, B.S. and A.R. Satoskar, *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment.* QJM, 2014. **107**(1): p. 7-14.
67. Esch, K.J. and C.A. Petersen, *Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals.* Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(1): p. 58-85.
68. Ashford, R.W., *The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.* Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1269-81.
69. Oliveira, C.I., et al., *Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis.* Drug Discovery Today: Disease Models, 2004. **1**(1): p. 81-6.
70. Palatnik-de-Sousa, C.B. and M.J. Day, *One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis.* Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 197.
71. Silva Junior, G.B., E.J. Barros, and F. Daher Ede, *Kidney involvement in leishmaniasis—a review.* Braz J Infect Dis, 2014. **18**(4): p. 434-40.
72. de Ruiter, C.M., et al., *Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy.* J Clin Microbiol, 2014. **52**(9): p. 3147-55.
73. WHO, *Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Manual for Case Management and Control.* 2012: p. 1-22.
74. Haldar, A.K., P. Sen, and S. Roy, *Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions.* Molecular Biology International, 2011. 2011: p. 23.
75. WHO, *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases.* 2013.

76. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35671.
77. Aagaard-Hansen, J., N. Nombela, and J. Alvar, *Population movement and neglected tropical diseases*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(11): p. 1281-8.
78. van Griensven, J., et al., *Leishmaniasis in immunosuppressed individuals*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(4): p. 286-99.
79. Alvar, J., et al., *Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(2): p. 298-319.
80. Singh, S., *Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of Leishmania-HIV co-infection in India*. Int J Infect Dis, 2014. **29**: p. 103-12.
81. Marques, N., et al., *[Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era]*. Acta Med Port, 2007. **20**(4): p. 291-8.
82. Campino, L., et al., *[Cutaneous leishmaniosis in Portugal due to Leishmania infantum MON-1]*. Acta Med Port, 2005. **18**(6): p. 475-7.
83. Ponte-Sucre, A. *Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy*. Kinetoplastid Biology and Disease, 2003. **2**, DOI: doi:10.1186/1475-9292-2-14
84. Freitas-Junior, L.H., et al., *Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?* International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 2012. **2**: p. 11–19.
85. Saudagar, P. and V.K. Dubey, *Molecular mechanisms of in vitro betulin-induced apoptosis of Leishmania donovani*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **90**(2): p. 354-60.
86. Frezard, F., C. Demicheli, and R.R. Ribeiro, *Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs*. Molecules, 2009. **14**(7): p. 2317-36.
87. Sengupta, S., et al., *Cryptolepine-Induced Cell Death of Leishmania donovani Promastigotes Is Augmented by Inhibition of Autophagy*. Molecular Biology International 2011: 187850, 2011.
88. Singh, N., M. Kumar, and R.K. Singh, *Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets*. Asian Pac J Trop Med, 2012. **5**(6): p. 485-97.
89. Job, A.E., et al., *Nanoparticle Technology: An alternative approach for Leishmaniasis Treatment*, in *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, D.D. Claborn, Editor. 2014.
90. Seifert, K., *Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development*. Open Med Chem J, 2011. **5**: p. 31-9.

91. Barry, C.E., 3rd, et al., *Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **59**(3): p. 221-31.
92. Reguera, R.M., et al., *Target-based vs. phenotypic screenings in Leishmania drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf?* *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2014. **4**(3): p. 355-7.
93. Laurent, T., et al., *Epidemiological dynamics of antimonial resistance in Leishmania donovani: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal*. *Infect Genet Evol*, 2007. **7**(2): p. 206-12.
94. Tiuman, T.S., et al., *Recent advances in leishmaniasis treatment*. *Int J Infect Dis*, 2011. **15**(8): p. e525-32.
95. Cunningham, M.L., M.J. Zvelebil, and A.H. Fairlamb, *Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals*. *Eur J Biochem*, 1994. **221**(1): p. 285-95.
96. Ashutosh, S. Sundar, and N. Goyal, *Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania*. *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 2): p. 143-53.
97. Demicheli, C., et al., *Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 100-3.
98. Sundar, S., et al., *Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic*. *Clin Infect Dis*, 2000. **31**(4): p. 1104-7.
99. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug Resistance in Leishmaniasis*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. **19**(1): p. 111-26.
100. Monge-Maillo, B. and R. Lopez-Velez, *Therapeutic options for visceral leishmaniasis*. *Drugs*, 2013. **73**(17): p. 1863-88.
101. Croft, S.L. and G.H. Coombs, *Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. *Trends Parasitol*, 2003. **19**(11): p. 502-8.
102. Roberts, C.W., et al., *Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa*. *Mol Biochem Parasitol*, 2003. **126**(2): p. 129-42.
103. Brotherton, M.C., et al., *Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in Leishmania infantum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2014. **4**(2): p. 126-32.
104. Mbongo, N., et al., *Mechanism of Amphotericin B Resistance in Leishmania donovani Promastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(2): p. 352–357.

105. Fox, K.R., C.E. Sansom, and M.F. Stevens, *Footprinting studies on the sequence-selective binding of pentamidine to DNA*. FEBS Lett, 1990. **266**(1-2): p. 150-4.
106. Sundar, S., et al., *Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis*. N Engl J Med, 2002. **347**(22): p. 1739-46.
107. Sundar, S., et al., *Short-Course Paromomycin Treatment of Visceral Leishmaniasis in India: 14-Day vs 21-Day Treatment*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(6): p. 914-8.
108. de Macedo-Silva, S.T., et al., *In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against Leishmania amazonensis*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83247.
109. Balana-Fouce, R., et al., *Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2014. **4**(3): p. 326-37.
110. Yeates, C., *Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute)*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(10): p. 1446-52.
111. Jha, T.K., et al., *A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(6): p. 1005-11.
112. Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopoulou, *Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(4-5): p. 257-66.
113. Lopez-Martin, C., et al., *Sitamaquine sensitivity in Leishmania species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(11): p. 4030-6.
114. Rocha, L.G., et al., *A review of natural products with antileishmanial activity*. Phytomedicine, 2005. **12**(6-7): p. 514-35.
115. Sen, R. and M. Chatterjee, *Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis*. Phytomedicine, 2011. **18**(12): p. 1056-69.
116. Liby, K., et al., *Novel semisynthetic analogues of betulinic acid with diverse cytoprotective, antiproliferative, and proapoptotic activities*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(7): p. 2113-9.
117. Boryczka S, M.E., Jastrzebska M, Kusz J, Zubko M, Bebenek and E., *X-Ray Crystal Structure of Betulin–DMSO Solvate*. J Chem Crystallogr 2012. **42**: p. 345–351.
118. Moghaddam, M.G., F.B.H. Ahmad, and A. Samzadeh-Kermani, *Biological Activity of Betulinic Acid: A Review*. Pharmacology & Pharmacy, , 2012. **3**(2): p. 119-123.
119. Alakurtti, S., et al., *Anti-leishmanial activity of betulin derivatives*. J Antibiot (Tokyo), 2010. **63**(3): p. 123-6.
120. Chowdhury, S., et al., *Novel Betulin Derivatives as Antileishmanial Agents with Mode of Action Targeting Type IB DNA Topoisomerases*. Mol Pharmacol, 2011. **80**(4): p. 694-703.

121. Pohjala, L., et al., *Betulin-derived compounds as inhibitors of alphavirus replication*. J Nat Prod, 2009. **72**(11): p. 1917-26.
122. Boryczka, S., et al., *Synthesis, structure and cytotoxic activity of new acetylenic derivatives of betulin*. Molecules, 2013. **18**(4): p. 4526-43.
123. Yogeewari, P. and D. Sriram, *Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties*. Curr Med Chem, 2005. **12**(6): p. 657-66.
124. Melnikova, N., et al., *A practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on aluminium solid support*. Molecules, 2012. **17**(10): p. 11849-63.
125. Dehelean, C.A., et al., *Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation*. Chem Cent J, 2012. **6**(1): p. 137.
126. Santos, R.C., et al., *Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(17): p. 6241-50.
127. Sauvain, M., et al., *Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (dilleniaceae)*. Phytotherapy Research, 1996. **10**(1): p. 1-4.
128. Alakurtti, S., et al., *Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(4): p. 1573-82.
129. Chowdhury, A.R., et al., *Dihydrobetulinic Acid Induces Apoptosis in Leishmania donovani by Targeting DNA Topoisomerase I and II: Implications in Antileishmanial Therapy*. Mol Med, 2003. **9**(1-2): p. 26-36.
130. Takahashi, M., et al., *In vitro leishmanicidal activity of some scarce natural products*. Phytother Res, 2004. **18**(7): p. 573-8.
131. Domínguez-Carmona, D.B., et al., *Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives*. Phytomedicine, 2010. **17**(5): p. 379-82.
132. Graziose, R., et al., *Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae**. J Ethnopharmacol, 2012. **142**(2): p. 456-61.
133. Haavikko, R., et al. *Heterocycle-fused lupane triterpenoids inhibit Leishmania donovani amastigotes*. Med Chem Commun, 2014. **5**: 445–451. 134.
134. Leal, A.S., et al., *Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21 waf1 and NOXA in pancreatic cancer cells*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(19): p. 5774-86.

135. Drag-Zalesinska, M., et al., *Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009. **19**(16): p. 4814-7. 2009.
136. Cysne-Finkelstein, L., et al., *Leishmania amazonensis: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes*. *Exp Parasitol*, 1998. **89**(1): p. 58-62.
137. Mikus, J. and D. Steverding, *A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against Leishmania using the dye Alamar Blue*. *Parasitol Int*, 2000. **48**(3): p. 265-9.
138. Dutta, A., et al., *Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis*. *Parasitol Int*, 2005. **54**(2): p. 119-22.
139. Rothe, G., *Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry*. Cellular Diagnostics. Basis, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Eds.: Sack U., Tárnok A., Rothe G., Karger, Basel, 2009, 53-88.
140. Nunez, R., *DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry*. *Curr Issues Mol Biol*, 2001. **3**(3): p. 67-70.
141. Ormerod, M.G. *Flow Cytometry—A Basic Introduction*; De Novo software: Los Angeles, CA, USA, 2008. Available online: <http://flowbook.denovosoftware.com/> (accessed on 20 February 2015).
142. Ormerod, M.G., *Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 2002. **265**(1-2): p. 73-80. 2002.
143. Alakurtti, S., et al., *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin* *Eur J Pharm Sci*, 2006. **29**(1): p. 1-13..
144. Santos, R.C., et al., *Synthesis and structure–activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid*. *Bioorg Med Chem*, 2010. **18**(12): p. 4385-96. 2010.
145. Das B.B., et al., *Topoisomerase research of kinetoplastid parasite Leishmania, with special reference to development of therapeutics* *Indian J. Med. Res.* **123**, 221–232 (2006). 2006.
146. Santos, R.C., et al., *New betulinic acid derivatives induce potent and selective antiproliferative activity through cell cycle arrest at the S phase and caspase dependent*. *Biochimie*, 2011. **93**(6): p. 1065-75. 2011.
147. Fulda, S. and G. Kroemer, *Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers*. *Drug Discov Today*, 2009. **14**(17-18): p. 885-90. 2009.

148. Holy, J., et al., *Dimethylaminopyridine derivatives of lupane triterpenoids are potent disruptors of mitochondrial structure and function*. *Bioorg Med Chem*, 2010. **18**(16): p. 6080-8.
149. Zoratti, M., I. Szabo, and U. De Marchi, *Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?* *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1706**(1-2): p. 40-52. 2005.
150. Adade, C.M. and T. Souto-Padron, *Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs*. *Open Parasitol J*, 2010. 4: p. 178-187.