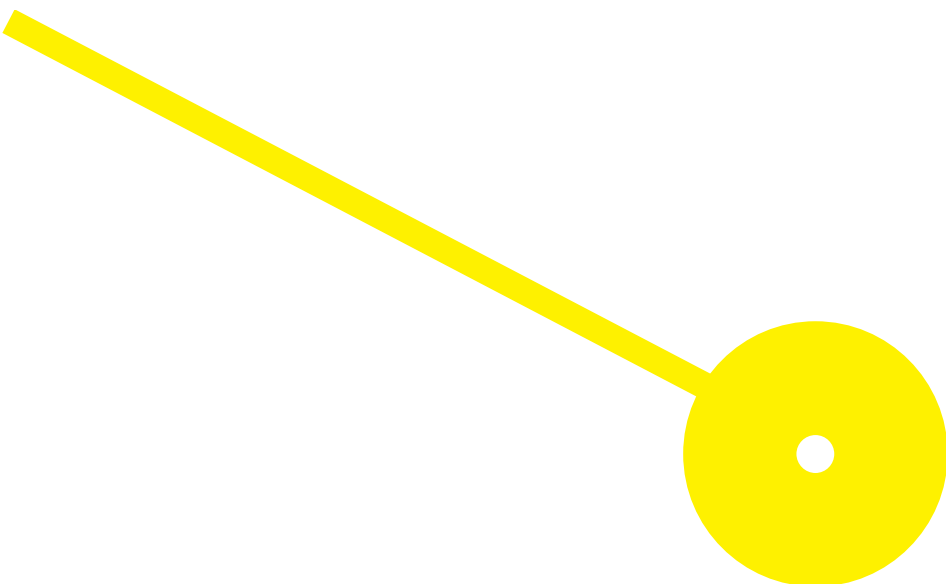




Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* a extratos das folhas de Neem (*Azadirachta indica*)

Jéssica Mariana Leonardo Cardoso

10/2019





**Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* a extratos das
folhas de Neem (*Azadirachta indica*)**

Autor

Jéssica Mariana Leonardo Cardoso

Orientadores

Professor Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz (ATC de Farmácia da Escola Superior de
Saúde do Instituto Politécnico do Porto)

Professora Doutora Sandra Gomes Pereira (ATC de Farmácia da Escola Superior de
Saúde do Instituto Politécnico do Porto)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Área de Especialização em Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização da presente dissertação de mestrado não seria possível sem o apoio e incentivo incondicional daqueles a quem estou eternamente grata.

Aos meus SUPER pais, António Cardoso e Paula Leonardo pela confiança que depositaram em mim desde o primeiro passo académico, por me terem motivado para mais este desafio, pela coragem, amizade, suporte e paciência perante todos os obstáculos que surgiram nesta longa caminhada e em toda a vida. A vocês dedico este trabalho, em forma de gratidão por tudo o que me proporcionam.

Às minhas queridas irmãs, Marli Cardoso e Luciana Cardoso pelas brincadeiras, pela aliança, compreensão e motivação nas adversidades. Sem vocês, os fins de semana não teriam tanto sabor nem aconchego suficiente para os 15 dias seguintes.

Ao meu maravilhoso namorado, Gianluca Bentivegna, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio incansável nesta etapa desafiadora, por ser um exemplo de conquistas, pela força, pelo seu sentido de humor, companheirismo e paciência em ajudar-me a superar todos os contratemplos que surgiram nestes largos meses. Fazes-me sonhar ainda mais alto! À sua família também, pelo carinho e incentivo interminável.

Às minhas incríveis amigas Cátia Mira, Helena Cardoso, Helena Pereira e Liliana Ribeiro, pelo companheirismo, pelas longas conversas e desabafos, pela motivação em cada conquista pessoal e académica. Mesmo longe a vossa presença foi sentida.

Aos meus adoráveis animais de estimação, Martin, Paco, Pantufa, Maggie e Max que nunca faltaram com o seu abanar da cauda nas minhas chegadas e com a sua fiel companhia.

Às colegas e investigadoras Lídia Rocha, Teresa Braga e Tsz Yan Chung do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) pela valiosa ajuda durante a preparação dos extratos testados neste trabalho.

À Dona Lurdes, Dona Elisabete e Dona Jerónima pela infindável paciência na lavagem e esterilização do material necessário durante todo o estudo experimental. Vocês foram incansáveis!

À Professora Doutora Cláudia Pinho pela enorme disponibilidade e amável atenção na transmissão de conteúdos práticos e teóricos mais específicos.

À Professora Doutora Lenea Campino da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL), que ofereceu gentilmente a estirpe de *Leishmania infantum* utilizada nesta dissertação de mestrado.

À empresa Bio4Life4You, na figura do CEO Doutor Joaquim Morgado pelo apoio prestado ao suportar os custos dos consumíveis necessários para este estudo.

À ESS - Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto por me acolher calorosamente durante estes anos, por me apresentar pessoas incríveis como os meus afilhados e colegas de turma e por me rodear de docentes e não docentes de excelência.

Por último, e com consciência de que sozinha nada disto seria possível, agradeço ao Professor Doutor Agostinho Cruz, docente, coordenador de mestrado e orientador da dissertação de mestrado, pela motivação, rigor e disponibilidade para orientar a realização do presente estudo, bem como, pelas opiniões e críticas na resolução de problemas e dúvidas que surgiram ao longo de toda a pesquisa e trabalho. À Professora Doutora Sandra Gomes Pereira, por aceitar o desafio de orientar também este estudo, pela sua inexplicável motivação, compreensão e apoio, bem como pela sua total disponibilidade e amabilidade nas explicações práticas e teóricas, pelas sugestões e breve resolução de contratemplos, mesmo nas horas mais difíceis.

A TODOS UM ORGULHOSO E ENORME OBRIGADA!

Resumo

A leishmaniose é a terceira zoonose parasitária mais comum no mundo e uma das doenças mais negligenciadas. Atualmente, são conhecidas várias espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania infantum* o agente etiológico da leishmaniose visceral, cujo principal reservatório e hospedeiro do parasita é o cão. A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infetados e representa um grave problema veterinário e de saúde pública, sobretudo nos países da bacia mediterrânica. Apesar do avanço científico no tratamento, diagnóstico e prevenção, a propagação da doença continua silenciosa e subestimada. O uso exaustivo das terapias farmacológicas convencionais em todo o Mundo, têm manifestado resistências e perfis severos de toxicidade, que justificam a necessidade urgente de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras. Os produtos naturais, usados ao longo dos séculos no tratamento empírico de inúmeras doenças, são cada vez mais alvo de estudo, por possuírem fitoconstituintes de elevado interesse farmacológico, nomeadamente com ação antiparasitária. Este é o primeiro relato da pesquisa científica da planta *Azadirachta indica* como potencial recurso terapêutico contra *Leishmania infantum*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, leishmaniose visceral, leishmaniose canina, atividade anti*Leishmania*, *Azadirachta indica*.

Abstract

Leishmaniasis is the third most common parasitic zoonosis in the world and one of the most neglected diseases. Currently, many species of *Leishmania* are known, being *Leishmania infantum* the etiological agent of visceral leishmaniasis, whose the main reservoir and host of the parasite is the dog. Transmission occurs through the bite of infected female sandflies and is a serious veterinary and public health problem, particularly in the countries of the Mediterranean basin. Despite scientific advances in treatment, diagnosis and prevention, the spread of the disease remains silent and underestimated. The exhaustive use of conventional pharmacological therapies around the world has shown resistance and severe toxicity profiles, which justify the urgent need for safer and more effective therapeutic alternatives. Natural products, used over the centuries in the empirical treatment of countless diseases, are increasingly being studied, because they possess phytoconstituents of high pharmacological interest, namely with antiparasitic action. This is the first report of scientific research on the *Azadirachta indica* plant as potential therapeutic resource against *Leishmania infantum*.

Keywords: *Leishmania infantum*, visceral leishmaniasis, canine leishmaniasis, anti*Leishmania* activity, *Azadirachta indica*.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	IX
Índice de tabelas.....	XI
Capítulo I.....	XI
Capítulo II.....	XI
Índice de figuras.....	XII
Capítulo I.....	XII
Capítulo II.....	XII
Preâmbulo.....	XIII
CAPÍTULO I – Revisão da literatura.....	1
1. <i>Leishmania</i> e a leishmaniose.....	2
1.1. Epidemiologia.....	3
1.1.1. No Homem.....	3
1.1.2. No cão.....	5
1.1.3. Em Portugal.....	6
1.2. Morfologia do parasita <i>Leishmania</i>	8
1.3. Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	9
1.4. Interação parasita-hospedeiro vertebrado.....	10
1.5. Diagnóstico.....	12
1.6. Tratamento farmacológico.....	12
1.6.1. No Homem.....	13
1.6.2. No cão.....	14
1.7. Controlo e prevenção.....	15
1.8. Urgência de novos fármacos.....	16
2. <i>Azadirachta indica</i>	17
2.1. Potencial anti <i>Leishmania</i>	18
Referências.....	21
CAPÍTULO II – Ensaio <i>in vitro</i>.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Preparação dos extratos das folhas de Neem.....	30
Manutenção dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	30
Determinação da curva de crescimento.....	31

Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti <i>Leishmania</i>	31
Análise estatística.....	32
Resultados e discussão.....	32
Caraterização do crescimento celular.....	32
Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti <i>Leishmania</i>	33
Conclusão.....	36
Agradecimentos.....	37
Conflitos de interesse.....	37
Referências.....	37
SÍNTESE	41

Índice de abreviaturas

A. indica – *Azadirachta indica*

AM – Extrato Aquoso obtido por moagem com Moínho

ANF-B – Anfotericina B

ARS – Administração Regional de Saúde

AAZ – Extrato Aquoso obtido por moagem criogénica com Azoto líquido

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DEET – N, N-dietil-3-metilbenzamida

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DGS – Direção Geral da Saúde

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTN – Doença Tropical Negligenciada

EMA – *European Medicines Agency*

FBS – Soro Fetal Bovino

GP63 – Glicoproteína de 63 kDa

IC₅₀ – Concentração Inibitória para 50% dos promastigotas

IFN- γ – Interferão gama

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IHMT-UNL – Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

IL-12 – Interleucina 12

IM – Intramuscular

IV – Intravenosa

LC – Leishmaniose Cutânea

LCan – Leishmaniose Canina

L. donovani – *Leishmania donovani*

L. infantum – *Leishmania infantum*

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LPG – Lipofosfoglicano

Log – Exponencial

LV – Leishmaniose Visceral

MAZ – Extrato Metanólico obtido por moagem criogénica com Azoto líquido

MeOH – Metanol

mL – Mililitro

MM – Extrato Metanólico obtido por moagem com Moínho

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NCI – *National Cancer Institute*

ND – Não descrito/ Não determinado

nm – Namómetro

OIE – *World Organisation for Animal Health*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON – Óxido Nítrico

ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses

PBS – Tampão Fosfato Salino

PNLVERAZ – Plano Nacional de Luta e Vigilância Epidemiológica da Raiva Animal e outras Zoonoses

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

rpm – Rotações por minuto

RPMI 1640 – Meio de cultura líquido, do inglês "*Roswell Park Memorial Institute*"

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

spp – espécies do mesmo género

SRE – Sistema reticuloendotelial

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

U – Unidades

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

Índice de tabelas

Capítulo I

Tabela I – Características dos fármacos atualmente usados nas formas de leishmaniose.....	13
Tabela II – Potencial anti <i>Leishmania</i> de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) contra <i>Leishmania</i> spp.....	19
Tabela III – Potencial anti <i>Leishmani</i> a de <i>Azadirachta indica</i> (Neem) contra <i>Leishmanias</i> spp. (continuação)	20

Capítulo II

Tabela I – Valores de IC ₅₀ dos extratos das folhas de <i>Azadirachta indica</i> contra promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> após 72h de exposição.....	34
---	----

Índice de figuras

Capítulo I

Figura 1 Distribuição geográfica das epidemias recorrentes nos países com carga elevada de leishmanioses.....	4
Figura 2 Distribuição da infecção canina por <i>Leishmania infantum</i> em regiões ou países europeus endêmicos e não endêmicos.....	5
Figura 3 A) Forma promastigota (ampliação 400x). B) Forma amastigota intra e extracelular (ampliação 100x em coloração Giemsa modificado).....	8
Figura 4 Ciclo de vida natural de <i>Leishmania infantum</i> e indicação das possíveis vias de transmissão não vetorial.....	9

Capítulo II

Figura 1 Curva de crescimento dos promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	32
---	----

Preâmbulo

A *Azadirachta indica* (*A. indica*), é uma árvore versátil, rica em constituintes bioativos que a galhardeiam como a “*village pharmacy*”. Vários estudos aprofundaram as suas propriedades medicinais, tendo-se verificado inclusive o seu potencial anti*Leishmania*. Nesse sentido, sendo *Leishmania infantum* um protozoário de transmissão zoonótica autóctone na região mediterrânica e, dadas as limitações das terapêuticas convencionais, surge a necessidade do desenvolvimento de alternativas farmacológicas para o controlo eficaz desta parasitose.

O objetivo principal desta dissertação de mestrado foi:

- ✓ avaliar *in vitro* a atividade anti*Leishmania* de extratos aquosos e metanólicos das folhas de *Azadirachta indica* em promastigotas de *Leishmania infantum*.

Para a concretização do objetivo principal, foram ainda definidos objetivos específicos:

- ✓ realizar uma revisão da literatura sobre a atividade anti*Leishmania* do Neem;
- ✓ preparar os extratos aquosos e metanólicos a partir das folhas da *Azadirachta indica*, e comparar dois processos distintos de pulverização: por moínho e por moagem criogénica com azoto líquido;
- ✓ implementar um ensaio *in vitro* de viabilidade celular para avaliar o potencial anti*Leishmania* dos extratos em estudo.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos distintos com a finalidade de organizar a informação e respetiva interpretação. Assim, o capítulo I aborda a revisão da literatura sobre a leishmaniose e o potencial anti*Leishmania* do Neem, enquanto o capítulo II destaca a componente prática do estudo que corresponde ao ensaio experimental *in vitro* onde se analisou a atividade dos extratos das folhas de *Azadirachta indica* contra promastigotas de *Leishmania infantum*.

Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* extratos das folhas de Neem (*Azadirachta indica*)

CAPÍTULO I

Este capítulo consiste numa revisão bibliográfica sobre o tema principal da dissertação, incluindo uma análise sobre a evidência científica da atividade anti*Leishmania* de *Azadirachta indica* (Neem).

1. *Leishmania* e a leishmaniose

A leishmaniose, é uma doença parasitária, causada por protozoários digenéticos do género *Leishmania* (família Trypanosomatidae), que é transmitida a hospedeiros vertebrados através da picada de flebotomíneos fêmeas infetados (Akhoundi *et al.*, 2017; OMS, 2017a). O termo emprega-se quando o indivíduo fica doente em consequência da infeção por *Leishmania* spp. e não apenas ao facto de ser portador do parasita, resultando num complexo de doenças mucocutâneas, cutâneas e viscerais em mamíferos, dependendo da localização dos parasitas nos tecidos infetados (Steverding, 2017). A leishmaniose mucocutânea (LMC) resulta da infeção de macrófagos da mucosa naso-orofaríngea com destruição parcial ou total da mucosa. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, que resulta da infeção de macrófagos da derme, causando lesões principalmente ulceradas, nas partes expostas do corpo. A leishmaniose visceral (LV), é a forma mais grave e fatal da doença, se não for tratada, e é caracterizada pela infeção de macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE) (OMS, 2010, 2017a).

Atualmente, são conhecidas 54 espécies do género *Leishmania*, das quais, sabe-se que 31 parasitam mamíferos e 21 são patogénicas para o Homem (Akhoundi *et al.*, 2016, 2017). O desenvolvimento da doença depende do vetor de transmissão, da espécie infetante e do seu perfil genético, e da resposta imunitária do hospedeiro (McGwire & Satoskar, 2014).

As infeções pelo parasita podem ser classificadas em duas categorias de acordo com a fonte da infeção no Homem. Fala-se em leishmaniose zoonótica quando o reservatório/ hospedeiro é um animal e em leishmaniose antroponótica quando o reservatório/ hospedeiro é o próprio Homem (OMS, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), inclui a leishmaniose no grupo das doenças tropicais negligenciadas (DTN), devido à elevada morbilidade e mortalidade associada (OMS, 2010). Por ser uma doença transmissível carece de declaração obrigatória para que a monitorização seja contínua (Gaspar *et al.*, 2017a).

As más condições socioeconómicas, desnutrição, mudanças climáticas e ambientais, a mobilidade populacional e condições imunossupressoras, como a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), são fatores de risco para a disseminação da infeção (OMS, 2015). A propagação da doença permanece silenciosa, tendo em conta a manifestação tardia ou ausente. Além disso, o alto estigma social, que leva ao isolamento dos doentes devido às cicatrizes e deformações físicas consequentes da patologia, torna a *Leishmania* uma ameaça latente para a saúde pública.

1.1. Epidemiologia

A leishmaniose é uma parasitose disseminada um pouco por todo o Mundo. É endêmica nas regiões tropicais, subtropicais e bacia do Mediterrâneo, abrangendo mais de 98 países (OMS, 2010). Como a notificação é obrigatória em apenas 34% dos países endêmicos, a carga exata da doença permanece desconhecida (OMS, 2015). A carência de sistemas de vigilância epidemiológica apropriados ou de métodos de diagnóstico, apenas permitem acesso a estimativas baseadas nos dados de incidência disponíveis (Pace, 2014).

A epidemiologia da doença depende das características ecológicas dos locais de transmissão, da espécie do parasita, da exposição prévia ou atual ao protozoário e do comportamento do Homem face à enfermidade (OMS, 2010). Nas duas últimas décadas, a leishmaniose expandiu a sua distribuição geográfica, representando um grave problema de saúde pública e uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos (OMS, 2015).

1.1.1. No Homem

Por ser uma doença silenciosa, a maioria dos indivíduos infetados não manifesta qualquer sintoma, o que dificulta a sua deteção e a quantificação do número de doentes. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas das áreas endêmicas estejam em risco de contrair a infeção e que surjam, anualmente, 0,7 a 1 milhão de novos casos e 26.000 a 65.000 mortes por leishmaniose (OMS, 2019).

As epidemias recorrentes de LV distribuem-se a nível mundial, mas predominam no Brasil, África Oriental e Sudeste Asiático, já a LC e LMC afetam principalmente o Médio Oriente, a bacia Mediterrânea, a Ásia Central e algumas regiões da América do Sul (figura 1) (OMS, 2017a). Em 2016, a Organização Mundial de Saúde atualizou a informação epidemiológica através dos dados de vigilância dos países cuja carga da doença é elevada, tendo sido relatados em 2015, 21.909 casos de LV e 138.575 casos cutâneos, ambos incluindo casos primários e de recaída. Nesse ano, a maior incidência de LV foi de 35,63 / 10.000 habitantes e de 22,74 / 10.000 habitantes para as formas cutâneas (OMS, 2017a).

Tal como referido anteriormente, a LV é a forma mais grave e fatal da doença, com uma taxa de mortalidade de 75% a 95% se não for tratada (Ready, 2014). Os agentes etiológicos são a *Leishmania donovani* (*L. donovani*) e *Leishmania infantum* (*L. infantum*), responsáveis por afetar cerca de 400.000 pessoas e desencadear até 40.000 mortes por ano (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011; Ready, 2014). A infeção visceral por *L. donovani* é dominante no subcontinente Indiano e na África Oriental, onde a transmissão é predominantemente antroponótica, sendo também conhecida por *kala-azar* ou morte negra. A transmissão de *L. infantum* é zoonótica e ocorre no Médio Oriente, Ásia Central, China, nas regiões mais secas da América Latina e nas regiões do Mediterrâneo (Ready, 2014).

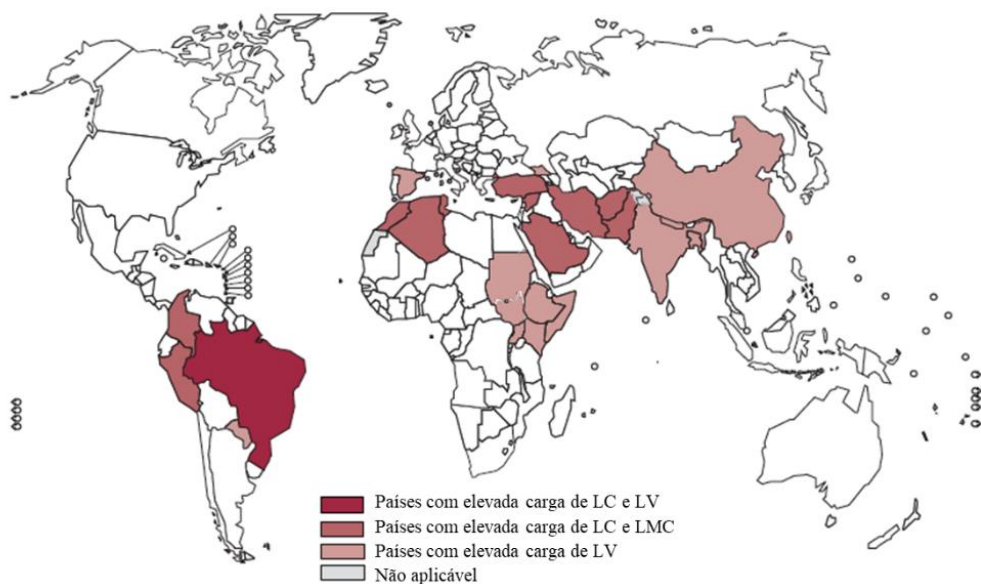


Figura 1| Distribuição geográfica das epidemias recorrentes nos países com carga elevada de leishmanioses. Adaptado de: OMS, 2017.

Nas áreas endêmicas onde ocorre infecção visceral por *Leishmania infantum*, a faixa etária entre o primeiro e quarto ano de idade foi a mais afetada, porém, a partir da década de 80, nos países mediterrânicos europeus, verificou-se uma diminuição do número de casos em crianças e um aumento da infecção nos adultos, particularmente imunodeprimidos associados ao VIH e/ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (OMS, 2010, 2015). A LV acelera a replicação do VIH e a evolução da doença, o que contribui para o aumento das taxas de recaída e mortalidade, representando um enorme desafio nas regiões onde a taxa de coinfeção é elevada (Lindoso *et al.*, 2018). Em 2013, um total de 35 países endêmicos notificaram casos de coinfeção por VIH (OMS, 2015).

Entre vários zimodemes de *L. infantum*, o mais prevalente e responsável pela LV, é o MON-1, que representa aproximadamente 70% de todas as estirpes identificadas. É o zimodeme endêmico na Europa, apresentando valores percentuais de 96,7% em Portugal, 88% no sul de França, mais de 50% em Itália e mais de 40% em Espanha, e representa 73% das coinfeções de VIH/LV (Kuhls *et al.*, 2008).

Dependendo do zimodeme, a *Leishmania infantum* provoca duas formas da doença, a leishmaniose visceral e cutânea (Campino *et al.*, 2006). Segundo a OMS, a incidência anual é de 1.100 – 1.900 casos de LV e de 10.000 – 17.000 casos de LC. Os países mais afetados por LV são: Espanha, Albânia, Itália e a Turquia, enquanto a LC predomina na Turquia e Israel (OMS, 2010, 2017b). A transmissão autóctone ocorre em Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia, Malta, Chipre, Croácia, Albânia, Bulgária e Turquia, mas o aumento do movimento internacional de viajantes, resultou na importação de casos de leishmaniose para países não endêmicos (Pace, 2014). A alta prevalência de portadores assintomáticos no Sul da Europa sugere que esta espécie é uma ameaça latente (Ready, 2010). O principal reservatório e hospedeiro de *L. infantum* zimodeme MON-1 é o cão, o que complica o controlo da doença, tornando-a num grave problema veterinário e de saúde pública (Kuhls *et al.*, 2008).

1.1.2. No cão

A leishmaniose canina (LCan) é causada por *Leishmania infantum* e representa uma das zoonoses parasitárias mais preocupantes para a saúde pública (Otranto & Dantas-Torres, 2013). Trata-se de uma doença complexa com vários graus de gravidade e vasto espectro de manifestações clínicas inespecíficas, similares à forma visceral humana, conjuntamente com lesões cutâneas (Baneth *et al.*, 2008; Otranto & Dantas-Torres, 2013). Os sinais mais comuns consistem em linfadenomegalia, onicogribose, claudicação, anorexia, lesões oculares, epistaxe, anemia e disfunção renal (Maia & Cardoso, 2015).

Nas regiões endémicas, existe uma elevada prevalência de animais infetados com o protozoário, cuja maioria são assintomáticos (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Maia & Cardoso, 2015). Os estudos epidemiológicos com técnicas moleculares indicam que a prevalência de infeção é muito maior do que a proporção que desenvolve a doença, facto que não deve desvalorizar a provável transmissão ao vetor (Baneth *et al.*, 2008).

A maioria dos dados epidemiológicos de LCan surgem de pequenos estudos científicos ou de programas locais, o que subnotifica o seu verdadeiro impacto e emergência/ reemergência (OMS, 2018). Estima-se que na Europa, cerca de 700 pessoas sejam afetadas pela enfermidade anualmente (Millán *et al.*, 2014).

Um estudo de seroprevalência em 15 milhões de cães de Espanha, Portugal, Itália e França demonstrou que cerca de 2,5 milhões (16,7%) dos animais estavam infetados com o protozoário (Moreno & Alvar, 2002). O aumento do número de adoções e transporte de cães de áreas endémicas para áreas não endémicas, e vice-versa, resultou na introdução e disseminação da doença, amplificando o potencial zoonótico da enfermidade e a sua situação epidemiológica (figura 2) (Otranto & Dantas-Torres, 2013).

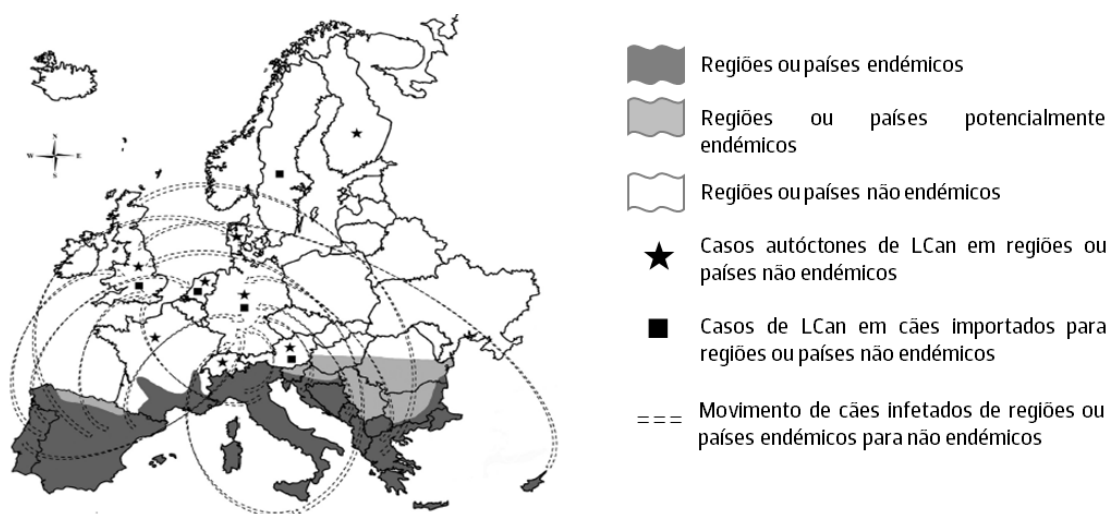


Figura 2| Distribuição da infeção canina por *Leishmania infantum* em regiões ou países europeus endémicos e não endémicos. Adaptado de: Maia & Cardoso, 2015.

Apesar de não ser clara a relação entre a prevalência da doença no cão e no Homem, a presença de cães infetados possui um papel determinante na manutenção da endemia (Campino & Maia, 2010). A vigilância de LCan e a sua notificação constituem um papel crucial para a saúde pública, porque permitem a monitorização do risco de infeção local, e por isso, a OMS recomenda a notificação anual do número de casos de leishmaniose em cães (OMS, 2018).

1.1.3. Em Portugal

A transmissão de *L. infantum* em Portugal é autóctone e a prevalência é significativa, embora sucedam casos esporádicos em todo o país, estão identificados três focos endémicos: a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a região de Lisboa e a região do Algarve (Campino *et al.*, 2006; OMS, 2017b).

O primeiro caso de LV em Portugal foi descrito em 1910 numa criança do sexo feminino com 9 anos de idade, residente em Lisboa (Álvares, 1910). A forma visceral é predominante em Portugal, contudo, também já foram detetados vários casos de LC, e o primeiro foi descrito por Tavares em 1943 num adulto da região de Trás-os-Montes e Alto Douro (Campino *et al.*, 2006). O registo de 440 casos de LV notificados à Direção Geral da Saúde (DGS) em 1950, tornou-a numa doença de declaração obrigatória (DDO), devido à elevada incidência no país (Gaspar *et al.*, 2017a).

Entre 2000 e 2009, foram diagnosticados na Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 173 novos casos de LV, dos quais, 66 eram imunocompetentes (46 crianças e 20 adultos) e 107 imunodeprimidos, testemunhando uma diminuição do número de casos em crianças e um aumento dos casos em adultos, nomeadamente portadores de VIH (Campino & Maia, 2010). Nesse mesmo período, apenas foram notificados à DGS, um total de 132 casos de LV (Gaspar *et al.*, 2017a). Esta discrepância demonstra a subnotificação da doença, mesmo que de declaração obrigatória, exigindo a necessidade emergente de notificar às autoridades competentes todos os diagnósticos e suspeitas da doença.

Estima-se uma incidência anual de 20 a 30 casos (OMS, 2017b). De acordo com o último relatório de DDO da DGS, entre 2013 e 2016 foram notificados 35 casos de LV (Gaspar *et al.*, 2017a), tendo a Administração Regional de Saúde (ARS) da área geográfica de Lisboa e Vale do Tejo declarado um total de 16, seguida pelo Norte (9), Alentejo (5) e restantes no Algarve (3) e Centro (2) (Gaspar *et al.*, 2017b). É de realçar que a maioria das coinfeções VIH/LV estão concentradas na região de Lisboa (OMS, 2017b). O reduzido número de notificações em Portugal neste período, não é indicador de que a doença está a ser erradicada, mas poderá ser o resultado da mitificação da doença, subestimando-a. O destaque do número de casos na área geográfica de Lisboa e Vale do Tejo sensibiliza para a necessidade de uma vigilância contínua e implementação sucessiva de programas sustentáveis na deteção e controlo da doença não só neste foco, como em todo o país.

No que diz respeito à LCan, os estudos epidemiológicos realizados ao longo dos anos, revelam que o número de casos tem aumentado, estimando-se uma prevalência de cerca 20% nas regiões endémicas (Campino & Maia, 2010). Segundo um inquérito soropidemiológico executado por Abranches e seus

colaboradores em 1980 na região de Lisboa, a taxa de prevalência de LCan obtida foi de 5,5%, mas no estudo executado por Cortes e investigadores em 2002, o predomínio de infeção na mesma região, foi de 18,4% (Abranches *et al.*, 1983).

Em 2008, um conjunto de médicos veterinários e investigadores fundaram o Observatório Nacional das Leishmanioses (ONLeish), com o objetivo de implementar uma rede de vigilância epidemiológica para a leishmaniose canina e humana (Campino & Maia, 2010), realizando no ano seguinte um estudo epidemiológico em 3.974 cães de 18 distritos, para identificar os fatores de risco associados à enfermidade e a prevalência da mesma. Constatou-se uma seroprevalência nacional de 6,31%, que variou entre 0,88% a 16,16% a nível distrital, com maior prevalência nas regiões do interior do país (Bragança, Vila Real, Portalegre, Castelo Branco e Santarém) sobretudo em cães com mais de 2 anos e com estilo de vida exterior, sendo os mais suscetíveis a ser seropositivos (Cortes *et al.*, 2012).

A LCan, consta desde 2003, no Plano Nacional de Luta e Vigilância Epidemiológica da Raiva Animal e outras Zoonoses (PNLVERAZ), que consiste na identificação de sinais clínicos suspeitos de leishmaniose e outras doenças, e respetiva notificação, durante as campanhas oficiais de vacinação antirrábica. Os tutores dos animais com manifestações suspeitas, são aconselhados a realizar neles, testes de diagnóstico e /ou tratamento. Um resultado de suspeita de leishmaniose positivo, encarga início da terapêutica do animal, caso os tutores neguem o tratamento, devem recorrer à eutanásia do mesmo (DGAV, 2017). De acordo com o último relatório da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) sobre a ocorrência de zoonoses em Portugal Continental, foram identificados 441 casos de LCan em 2017, mais 33 casos que em 2016, apenas nestas campanhas (DGAV, 2018).

Posto isto, e considerando verdadeiramente que a LV em Portugal é subnotificada e que o número de casos de LCan continua a aumentar, o cão como principal reservatório do parasita e a presença de cães infetados, desempenham um papel crucial na manutenção da endemia (Campino e Maia 2010). Portanto, a realidade endémica e o fator de impacto na saúde pública e veterinária, justificam a necessidade acrescida para a realização de estudos que contribuam para o controlo da infeção.

1.2. Morfologia do parasita *Leishmania*

A *Leishmania infantum* é uma espécie de protozoário, pertencente à ordem Kinetoplastea, família Trypanosomatidae e género *Leishmania* (Akhoundi *et al.*, 2016). Os parasitas *Leishmania* spp. são organismos unicelulares, caracterizados pela presença de um flagelo e de um organelo rico em DNA mitocondrial, o cinetoplasto (Gramiccia, 2011). Apresentam duas formas morfológicamente distintas durante o seu ciclo de vida: promastigota ou amastigota (figura 3), que diferem quanto à sua motilidade e características biológicas (Zulfiqar *et al.*, 2017).

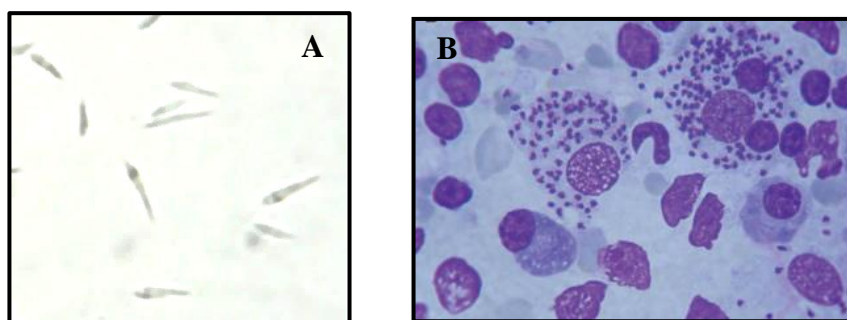


Figura 3| A) Forma promastigota (ampliação 400x). Fonte: J. Cardoso; B) Forma amastigota intra e extracelular (ampliação 100x em coloração Giemsa modificado). Adaptado de: Solano-Gallego *et al.*, 2011.

A forma promastigota (figura 3A), é extracelular e flagelada, que existe tipicamente no intestino do vetor flebotomíneo fêmea e tem 15–30 μm de comprimento, o que lhe confere o aspeto alongado (Gramiccia, 2011). O flagelo livre pode variar na sua forma e tamanho, tendo como funções a mobilidade e a aderência às microvilosidades do intestino do hospedeiro invertebrado (Zulfiqar *et al.*, 2017). No processo de desenvolvimento, os promastigotas multiplicam-se extracelularmente, envolvendo diversos estágios morfológicos, cujo estágio promastigota metacíclico constitui a fase final do desenvolvimento sequencial do parasita no trato digestivo do vetor (Bates, 1994). Esta é a forma infetante para o hospedeiro vertebrado, após inoculação, por possuir alta mutabilidade durante a transmissão e que permite a sua transformação para a forma amastigota (Zulfiqar *et al.*, 2017).

A forma amastigota (figura 3B), é intracelular, de corpo redondo ou oval e com 2,5 a 6,8 μm de diâmetro. Reside no interior das células fagocitárias mononucleares do hospedeiro, sobretudo nos macrófagos, onde se reproduz por divisão binária. Na sua membrana apresenta uma invaginação na região anterior do corpo, denominada de bolsa flagelar, mas é desprovida de flagelo livre, e por isso, imóvel (Gramiccia, 2011; Zulfiqar *et al.*, 2017).

1.3. Ciclo de vida de *Leishmania infantum*

As espécies de vetores flebotomíneos predominantes na Europa ocidental, nomeadamente em Portugal, são o *Phlebotomus perniciosus* e o *Phlebotomus ariasi* (Campino & Maia, 2010). Estes exibem atividade crepuscular e noturna, que se estende desde a primavera até ao final do outono, realçando que a sobrevivência do protozoário durante o inverno é garantida pelos reservatórios infetados, principalmente o cão (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011). Apenas os flebotomíneos fêmeas são hematófagos, enquanto os machos se alimentam somente de plantas (Dayakar *et al.*, 2015).

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. é digenético, ou seja, depende de dois hospedeiros para completar o ciclo: o vetor flebotomíneo fêmea (intermediário) e o mamífero (definitivo) (No, 2016). O vetor é infetado com o parasita após hematofagia de um hospedeiro infetado (figura 4). O ciclo de vida inicia aquando a ingestão de formas amastigotas que, ao atingirem o intestino do flebotomíneo, transformam-se em promastigotas procíclicos e posteriormente diferenciam-se e multiplicam-se morfologicamente (Bates, 1994).

Os promastigotas metacíclicos são a forma infetante do parasita, porque migram para a probóscide do vetor, para que na refeição seguinte sejam inoculados na pele do mamífero. Estes são fagocitados pelos macrófagos, que são ativados de imediato pela resposta inflamatória aquando a picada do flebotomíneo. Caso os promastigotas resistam à resposta imune, invadem e multiplicam-se no interior dos macrófagos, diferenciando-se na forma amastigota, onde concluem o seu ciclo de vida (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Dayakar *et al.*, 2015).

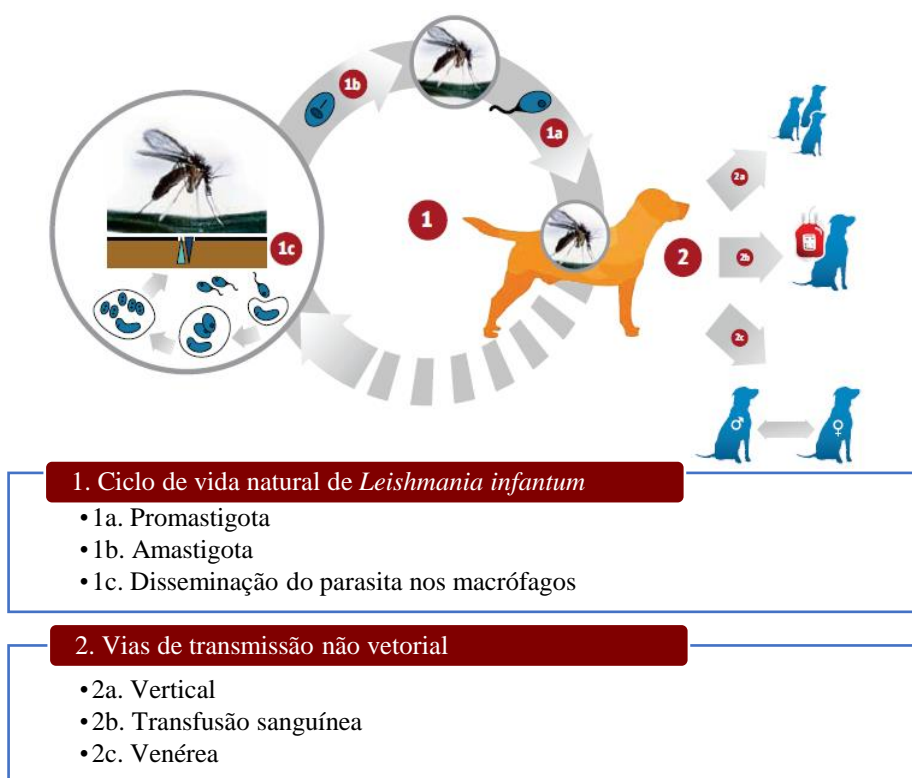


Figura 4| Ciclo de vida natural de *Leishmania infantum*(1) e indicação das possíveis vias de transmissão não vetorial (2). Adaptado de: Solano-Gallego *et al.*, 2011.

Os amastigotas replicam-se por bipartição no interior das células hospedeiras até que haja rompimento da membrana celular, libertando-se para infecção de outras células do SRE (Gharbi *et al.*, 2015), atingindo principalmente os tecidos do fígado, baço, medula óssea, gânglios linfáticos e cutâneos (OMS, 2010; No, 2016). A evolução da infecção depende da eficiência do sistema imunitário do hospedeiro definitivo.

Os flebotomíneos fêmeas são os únicos artrópodes confirmados como aptos na transmissão biológica do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2011) e, embora surjam especulações sobre o papel vetorial das carraças e pulgas na transmissão de *Leishmania infantum*, ainda não existem estudos que comprovem o seu envolvimento no ciclo de vida. A transmissão não vetorial no cão, como por exemplo a transmissão vertical ou venérea, também estão descritas e embora que raras, também devem ser consideradas (figura 4) (Solano-Gallego *et al.*, 2009, 2011; Otranto & Dantas-Torres, 2013).

1.4. Interação parasita-hospedeiro vertebrado

O processo de implementação do parasita no hospedeiro vertebrado envolve 3 etapas: (1) identificação e entrada no macrófago (alvo de eleição), (2) sobrevivência e proliferação no interior da célula hospedeira, (3) modulação da resposta imunitária. A infecção pode desencadear respostas distintas no organismo, desde a ausência da doença ao desenvolvimento de processos graves com manifestações patológicas diferentes (Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

O desfecho clínico e a evolução da doença dependem de uma série de fatores envolvidos na relação complexa e multifacetada entre o protozoário e o sistema imunitário do hospedeiro, uma vez que a resposta à infecção é determinada pela capacidade das células do SRE destruírem o parasita (Polinowskaia & Descoteaux, 2015; Lamotte *et al.*, 2017). Um desses fatores está ligado à virulência do microrganismo, que diz respeito ao grau de patogenicidade manifestado contra um hospedeiro cujo sistema imunitário se apresente imunocompetente (Chang *et al.*, 2003), entre outros fatores que permitem que o protozoário resista à resposta imune inata e adaptativa, para atender às suas necessidades metabólicas, fundamentais na proliferação intracelular e infecção persistente (Lamotte *et al.*, 2017).

Em condições imunes normais, os macrófagos, podem eliminar naturalmente os agentes patogênicos por via direta, através do óxido nítrico (ON) ou de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou por via indireta, através da produção de citocinas pró-inflamatórias: interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (Rodrigues *et al.*, 2015; Lamotte *et al.*, 2017).

O parasita, quando fagocitado, pode ativar mecanismos intrínsecos, que o capacitam de resistir às respostas imunológicas. A glicoproteína de 63 kDa (GP63) e o lipofosfoglicano (LPG) estão presentes na membrana plasmática e são os principais responsáveis pela virulência de *Leishmania spp.*, atuando na degradação da maioria das enzimas hidrolíticas e inibição parcial da produção de ROS. Ambas estão envolvidas na ativação da fração C3 do complemento que promove a adesão, penetração e sobrevivência do parasita no interior do macrófago (Sádlová & Volf, 1999; Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

Durante a fagocitose, os lisossomas fundem-se com o fagossoma (vacúolo parasitóforo), formando o fagolissoma (que tem como função eliminar o agente patogénico), mas os promastigotas evitam a fusão através do LPG e caso o fagolissoma se forme, a GP63 degrada a maioria das enzimas hidrolíticas, promovendo a sobrevivência intracelular do parasita e consequente transformação na forma amastigota que se adapta facilmente ao meio ácido conferido pelas enzimas (Desjardins & Descoteaux, 1997; Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

A modulação de outros mecanismos de resposta dos macrófagos envolve a interferência ou inibição da cascata de sinalização imunológica, nomeadamente a produção de ON, citocinas e antigénios, o que afeta as funções de combate imunitário, facilitando a adesão e multiplicação do protozoário a nível intracelular. Como última defesa, o macrófago pode eventualmente sofrer apoptose, mas o parasita atrasa o processo e utiliza-o como via de infeção para as células não infetadas do SRE, de forma a diminuir a exposição ao reconhecimento imunológico extracelular (Podinovskaia & Descoteaux, 2015). A resposta a esta interação complexa e multifacetada varia entre espécies e estirpes de *Leishmania*, e com os fatores genéticos do hospedeiro (Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose inicia com a avaliação do histórico descrito pelo doente ou tutor do animal, bem como os sinais e sintomas, em combinação com testes parasitológicos, serológicos e moleculares, que variam entre si no que diz respeito à sensibilidade e especificidade (OMS, 2017a; OIE, 2018).

No Homem, o período de incubação do parasita varia de 10 dias a mais de 1 ano, cujas manifestações clínicas podem ter início súbito ou progressivo. Os sinais e sintomas mais comuns incluem perda de peso, febre, esplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (principalmente pelo aumento da imunoglobulina G) (OMS, 2010). Nos cães, o período de incubação varia de 3 meses a 7 anos, cuja a maioria dos infetados são portadores assintomáticos que podem não manifestar a doença (Miró, *et al.*, 2008), por isso, em Portugal, durante as campanhas oficiais de vacinação antirrábica identificam-se sinais clínicos suspeitos de leishmaniose, para aconselhar os proprietários a realizar testes de diagnóstico (DGAV, 2017). Os sinais típicos em cães que desenvolvem a doença envolvem linfonodomegalia, onicogribose, claudicação, anorexia, lesões oculares, epistaxe, anemia e disfunção renal (Maia & Cardoso, 2015; OIE, 2018).

A suspeita de LV deve ser suscitada em doentes que vivam ou tenham visitado uma zona endémica e que apresentem febre e esplenomegalia. Por vezes os sinais e sintomas, isolados ou combinados, podem desviar a suspeita de leishmaniose por descrição de manifestações semelhantes a outras doenças, como por exemplo a malária, no caso do Homem, que por vezes, não são específicos o suficiente. No caso de doentes com coinfeção por VIH, as características clínicas podem ser atípicas. O teste do VIH/SIDA deve aplicar-se a todos os diagnósticos de LV, porque o prognóstico exige um tratamento diferente (OMS, 2010).

Por estas razões, é importante o uso de múltiplas abordagens de diagnóstico para aumentar a fiabilidade do resultado final, no entanto, as técnicas aplicadas acabam por depender fortemente do nível da política do sistema de saúde em vigor (Aronson *et al.*, 2017).

1.6. Tratamento farmacológico

As leishmanioses têm várias opções farmacológicas, mas dentro da complexidade de cada uma, os principais objetivos do tratamento ideal consistem na facilidade de administração do(s) medicamento(s), controlo da doença e redução do risco de recidivas (OMS, 2010).

O perfil terapêutico pode variar de acordo com as diretrizes regionais, espécie do parasita, carga parasitária, manifestações clínicas e patologias concomitantes, respeitando a avaliação prévia do risco-benefício e as considerações sobre saúde pública, como a prevenção de resistência a medicamentos (Zulfiqar *et al.*, 2017; OMS, 2010, 2019).

Atualmente, a monoterapia está em desvantagem, colocando os fármacos em perfis terapêuticos combinados para reduzir a dose a administrar, os efeitos adversos e a duração do tratamento, aumentar a eficácia e prevenir o risco de resistência (Zulfiqar *et al.*, 2017).

Quer no Homem, quer no cão, a leishmaniose é uma doença tratável e curável, mas está dependente de uma resposta imunocompetente, porque os fármacos instituídos não eliminam o parasita, não se descartando a hipótese de recaída em caso de imunossupressão (OMS, 2010; Miró *et al.*, 2017). Por isso, a falta de resposta à terapêutica farmacológica, recaída após o tratamento, a manifestação de efeitos adversos, a não adesão ao tratamento e o custo do fármaco, são as principais razões para a implementação de outros protocolos terapêuticos que não os habituais.

1.6.1 No Homem

Atualmente, o tratamento das três formas de leishmaniose depende principalmente de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (ANF-B), a pentamidina, a miltefosina e a paramomicina (Tabela I). Os casos graves de leishmaniose visceral, se não forem tratados, são geralmente fatais (OMS, 2010).

Tabela I – Características dos fármacos atualmente usados nas formas de leishmaniose.

Fármaco	Via de administração	Eficácia	Resistência	Tipo de doença
Antimoniais pentavalentes	IV IM	Varia entre 35-95% dependendo da região	Comum no Bihar, Índia > 65%	LV (exceto no Bihar, Índia) LC
Desoxicolato de anfotericina B	IV	> 90%	Cepas de laboratório	LV LC
Anfotericina B Lipossômica	IV	> 96%	Não documentada	LV
Anfotericina B de emulsão lipídica	IV	> 86%	Não documentada	LV
Miltefosina	Oral	> 94%	Cepas de laboratório	LV
Paramomicina	Tópica IM	> 94% na Ásia 46-85% na África	Cepas de laboratório	LC LMC
Pentamidina	IM	Varia entre 36-96% dependendo da região	Não documentada	LV LC

IV: Intravenosa; IM: Intramuscular
Adaptado de: Zulfiqar *et al.*, 2017

Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) têm sido desde 1940, os fármacos de primeira linha no tratamento da LV na maioria das regiões endêmicas (OMS, 2010, 2017b). No entanto, apesar de possuírem uma eficácia superior a 90%, estão associados a elevada toxicidade e resistência, cuja falha terapêutica se destaca principalmente na Índia e no Nepal onde a resistência é superior a 65% (OMS, 2010; Zulfiqar *et al.*, 2017). Atualmente a monoterapia de ANF-B lipossômica ou a combinação com miltefosina são as opções farmacológicas de eleição no subcontinente indiano (Zulfiqar *et al.*, 2017).

Na Europa, as diretrizes da OMS para tratamento da LV causada por *Leishmania infantum* incluem a ANF-B lipossômica em monoterapia como fármaco de primeira linha e os antimoniais pentavalentes como segunda linha (No, 2016; OMS, 2017b). Outras fórmulas de ANF-B foram desenvolvidas, mas revelaram-se

consideravelmente mais tóxicas e com eficácia inferior à lipossômica (OMS, 2010). A anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos, que pode ser usado em todas as formas de leishmaniose (Iqbal *et al.*, 2016). A atividade anti-*Leishmania* está relacionada com os esteróis, principalmente com o ergosterol, que é um composto presente na membrana celular do parasita *Leishmania* spp. (Oliva *et al.*, 2010; OMS, 2010). A interferência na biossíntese do ergosterol aumenta a permeabilidade da membrana parasitária, o que facilita a entrada do fármaco, promovendo a morte dos parasitas (Ouellette *et al.*, 2004).

Em situações especiais, como a gravidez, amamentação, coinfeção VIH/LV, crianças e idosos, as formulações com ANF-B são a melhor opção farmacológica (OMS, 2010, 2017b; Aronson *et al.*, 2017). Nos casos imunocompetentes com intolerância ao fármaco, os antimoniais pentavalentes são prioritários nas regiões onde a existência de espécies de *Leishmania* resistentes é nula ou baixa, caso contrário, é viável optar por outro fármaco na dose e duração adequados conforme as diretrizes em vigor (Aronson *et al.*, 2017).

A melhoria clínica no final do tratamento é indicador de cura inicial e após 6 meses na ausência de recidiva clínica declara-se cura definitiva (OMS, 2010). Ainda não existem vacinas ou quimioprolifáticos para uso geral contra a leishmaniose devido à variabilidade de espécies de *Leishmania* (Millán *et al.*, 2014; Aronson *et al.*, 2017; Miró *et al.*, 2017), mas mantém-se a persistente esperança na investigação e desenvolvimento de uma formulação eficaz.

1.6.2 No cão

O tratamento da LCan é também um desafio complexo para a medicina veterinária, tendo em conta o percurso imprevisível da doença. Os medicamentos anti-*Leishmania* usados atualmente em cães foram descobertos e desenvolvidos para tratar a leishmaniose nos humanos, cujos protocolos terapêuticos foram posteriormente adaptados. Nos cães, é extremamente importante vigiar se os fármacos são corretamente administrados e examiná-los durante e após a conclusão do tratamento (Oliva *et al.*, 2010).

Segundo a revisão da literatura realizada por Oliva e colaboradores em 2010, os fármacos comumente utilizados na LCan, por ordem decrescente de citações, são: os antimoniais pentavalentes, o alopurinol, a paramomicina, a ANF-B, a miltefosina, a pentamidina, a espiramicina em combinação com o metronidazol, a marbofloxacina, a enrofloxacina e a domperidona. Qualquer plano farmacoterapêutico pode levar à remissão temporária ou permanente da situação clínica, mas nenhum é suficientemente eficaz para eliminar por completo a infeção, pelo que as recidivas são muito frequentes.

A combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol, é o protocolo terapêutico mais comum e considerado primeira linha na LCan por permitir um período de remissão clínica mais longo do que em monoterapia, ocorrendo recaídas quando o tratamento é interrompido (Miró *et al.*, 2017). Este protocolo, quando aplicado corretamente, resulta na redução da carga parasitária por vários meses, deixando os cães num estado não infeccioso ou com um baixo índice de infeção para os flebotomíneos (Oliva *et al.*, 2010). O antimoniato de meglumina inibe seletivamente a glicólise e oxidação dos ácidos gordos, fundamentais na

diferenciação e crescimento do parasita, induzindo uma redução generalizada na carga parasitária e restauração da resposta imune. O alopurinol, atua a nível intracelular nos amastigotas, onde é transformado num composto tóxico capaz de induzir a sua morte, mas a baixa atividade, quando em monoterapia, deve-se provavelmente à ausente ou insuficiente transformação do fármaco (Oliva *et al.*, 2010).

A ANF-B lipossômica tem a mesma eficácia que nos humanos, contudo não é muito usada devido ao custo elevado, à complexidade de preparação e à via de administração, mas também porque a OMS desencorajou o seu uso para evitar a eventual ocorrência de resistências de *Leishmania spp.*, que são, hoje em dia, uma questão bastante pertinente para a medicina humana e veterinária (Oliva *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2017).

1.7 Controlo e prevenção

A transmissão da leishmaniose zoonótica ou antroponótica envolve um conjunto complexo de intervenientes que exigem uma combinação de estratégias para controlar ou prevenir a doença, o que impossibilita o uso de uma só medida. As principais recomendações da OMS para os países endémicos consistem na adoção de comportamentos que implicam o controlo de vetores através do uso de mosquiteiros e inseticidas, o cumprimento terapêutico nos casos detetados, notificação e vigilância de doentes e portadores (OMS, 2019). Outras medidas preventivas envolvem: evitar as atividades ao ar livre, principalmente nas alturas em que os flebotómios são geralmente mais ativos (amanhecer e anoitecer), reduzir as áreas de pele exposta, aplicar inseticidas na pele, nos mosquiteiros, cortinas, lençóis e extremidades da roupa, sendo que os repelentes mais eficazes são aqueles que contêm N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) (CDC, 2018). O controlo de vetores reduz ou interrompe o ciclo de transmissão das leishmanioses, especialmente em ambiente doméstico (OMS, 2017a). O controlo da infeção no reservatório é a abordagem principal que garante a redução do risco de infeção no cão.

Na Europa estão atualmente disponíveis duas vacinas para administração em canídeos (CaniLeish® e Letifend®) (Miró *et al.*, 2017). A administração destina-se a cães seronegativos com mais de 6 meses de idade, cuja indução de imunidade dura pelo menos 1 ano (EMA, 2016). O intuito da imunoprofilaxia no cão, é induzir a resposta imunitária de forma a evitar a progressão da doença após a infeção. No entanto, ainda é necessário comprovar a sua eficácia na interrupção do ciclo de transmissão de *Leishmania infantum*, bem como a sua segurança e tolerância (Miró *et al.*, 2017). Tendo em conta a incerteza da sua eficácia, a vacinação pode fazer parte do programa de controlo da LCan, com uso simultâneo de repelentes contra o vetor para diminuir o risco de infeção. A utilização de formulações tópicas impregnadas com piretróides sintéticos, como por exemplo coleiras de deltametrina, são eficazes contra os flebotómios, reduzindo em 54% o risco de infeção (Oryan & Akbari, 2016; Miró *et al.*, 2017).

O futuro da disseminação da doença depende principalmente das metodologias de prevenção e controlo, que devem ser garantidas com o papel ativo do Homem na implementação de meios que promovam a educação sanitária e a vigilância epidemiológica.

1.8. Urgência de novos fármacos

Ainda que haja metodologias de prevenção, diagnóstico e tratamento, o acesso a estas ainda é muito limitado, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde as formas da doença são mais prevalentes. A emergência e/ou reemergência desta parasitose deve-se a uma multiplicidade de fatores dos quais se destacam as alterações ambientais, as condições socioeconômicas e a resistência dos parasitas e dos vetores aos fármacos instituídos (Campino & Maia, 2010; Zulfiqar *et al.*, 2017). As terapêuticas aplicadas no tratamento da LV estão fortemente comprometidas com o aparecimento de resistências. A evolução de fenótipos de *Leishmania spp.* resistentes a medicamentos tem sido associada à plasticidade do seu genoma, influenciada com a exposição aos fármacos (Lamotte *et al.*, 2017).

O arsenal terapêutico atualmente disponível é limitado a fórmulas antigas que têm vindo a ser amplamente utilizadas por falta de alternativas. As limitações dos antiparasitários comumente utilizados, englobam: falhas na terapêutica, perfis severos de toxicidade e resistências, mesmo que combinados, o que reforça a importância da investigação contínua de novos fármacos no combate à doença (Leprohon *et al.*, 2015; No, 2016; Zulfiqar *et al.*, 2017). São, urgentemente, ambicionadas alternativas terapêuticas mais eficazes e económicas, de curta duração, fácil administração e reduzida toxicidade, que previnam a transmissão e a infecção, cujo acesso ao tratamento seja facilitado, sobretudo nos países subdesenvolvidos.

Durante as duas últimas décadas, as pesquisas para a descoberta de novos fármacos pretendem identificar compostos que confiram uma resposta imunitária protetora, duradoura, equilibrada e direcionada ao agente etiológico (atuando no seu genoma ou em alvos específicos, como por exemplo enzimas ou proteínas), objetivando interferir na viabilidade e infetividade parasitária (Miró *et al.*, 2017; Zulfiqar *et al.*, 2017). No entanto, os avanços científicos no tratamento da leishmaniose ainda são escassos o que justifica a urgente necessidade de novos compostos farmacológicos como os de origem natural (OMS, 2010, 2017a).

Os produtos naturais, usados na medicina popular para prevenir e tratar inúmeras doenças, estão a ser, cada vez mais, alvos de pesquisa e de estudos em todo o Mundo. Reconhece-se que os derivados obtidos através de extratos das raízes, caules, folhas, flores ou frutos, são fontes naturais de constituintes bioativos, com várias propriedades terapêuticas, incluindo atividade antiparasitária (Hamdi *et al.*, 2018).

Segundo a revisão elaborada por Rodrigues *et al.* (2015), a *Glycyrrhiza glabra*, *Tanacetum parthenium*, *Baccharis uncinella*, *Dictyota paffii*, *Artemisia indica*, *Nectandra leucantha*, *Quassia amara*, *Vitis vinifera*, *Raputia heptaphylla*, *Galipea longiflora*, *Xylopiya discreta*, *Galium mexicanum*, *Laennecia confusa*, *Azadirachta indica*, *Lopezia racemosa*, *Croton caudatus*, *Baccharis uncinella*, *Sambucus nigra*, *Syzygium cumini*, *Artemisia annua*, *Piper nigrum*, *Tinospora cordifolia*, *Withania somnifera* e *Lophanthera lactescens* são plantas que possuem fitoquímicos, com atividade anti-*Leishmania* e imunomoduladora, cujo mecanismo de ação pode ser direto no parasita ou ter um efeito concomitante na resposta imunitária do hospedeiro vertebrado. Portanto, o estudo de alternativas de origem vegetal deve investigar compostos que resolvam os problemas associados à terapêutica farmacológica convencional e melhorem o quadro clínico da leishmaniose humana e canina.

2. *Azadirachta indica*

Durante séculos, as plantas têm sido a fonte de derivados naturais utilizados para prevenção e tratamento de diversas doenças. A *Azadirachta indica* é uma dessas plantas e é tradicionalmente conhecida por árvore de Neem ou Nim tendo sido descoberta pela primeira vez na Índia há mais de 4.500 anos (Patel *et al.*, 2016). *A. indica* pertence à família Meliaceae e é abundante nas regiões tropicais e subtropicais, como na Índia, Paquistão, Bangladesh e Nepal, onde é popularmente usada. É considerada uma planta medicinal segura e versátil por modular diversos processos biológicos (Alzohairy, 2016).

Em 1942, Salimuzzaman Siddiqui, isolou pela primeira vez um composto do óleo de *A. indica*, a nimbina (Siddiqui, 1942), pelo que, desde então, intensificou a investigação química dos compostos presentes na planta com a descoberta de mais de 300 constituintes de estrutura química diversa e complexa (Gupta *et al.*, 2017). Da árvore de Neem podem ser utilizados os frutos, flores, folhas, sementes e cascas, todos ricos em fitoquímicos que a qualificam como uma fonte valiosa de propriedades terapêuticas. Estas propriedades incluem (mas não se limitam) atividades anticancerígenas, antidiabéticas, cardioprotetoras, neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antivíricas, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antimaláricas, hepatoprotetoras, antinefrotóxicas, cicatrizantes, inseticidas e imunomoduladoras (Alzohairy, 2016; Gupta *et al.*, 2017; Saleem *et al.*, 2018). Devido aos seus múltiplos benefícios, é enaltecida como sendo a "*village pharmacy*" ou como a "árvore do século XXI" (Patel *et al.*, 2016). Os terpenoides, esteroides, flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, proteínas, ácidos gordos e ésteres, são exemplos de alguns grupos de compostos bioativos existentes na planta (Tiwari, *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2016). Extratos de Neem preparados com solventes, tais como: água, clorofórmio, etanol, butanol, acetato de etilo e hexano permitem obter alguns desses grupos. Os triterpenoides distinguem-se por serem a classe principal, nos quais estão incluídos os limonoides que representam um terço dos constituintes, tornando-se o grupo mais importante e estudado. Os limonoides, como por exemplo: azadiractina, azadiradiona, nimbolida, nimbina, salanina ou gedunina, encontram-se em abundância nas folhas e nos frutos e são altamente solúveis em solventes alcoólicos (Patel *et al.*, 2016; Chaudhary *et al.*, 2017). No entanto, o tipo de fitoconstituintes extraídos variam de acordo com as condições de crescimento, colheita, processamento e armazenamento da planta (Patel *et al.*, 2016).

2.1. Potencial anti*Leishmania*

Nos últimos anos, o interesse pela árvore de Neem tem sido uma tendência crescente no aprofundamento do estudo dos seus múltiplos benefícios, principalmente pelo aumento da procura de produtos de origem natural. Os estudos realizados com extratos de *A. indica* revelaram ser eficazes contra uma variedade de protozoários patogênicos, incluindo *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Leishmania* (Tiwari *et al.*, 2014). Vários limonóides existentes na *Azadirachta indica* foram reconhecidos *in vitro* pelas suas propriedades antimaláricas contra *Plasmodium falciparum* (Tahir *et al.*, 1999). A azadiractina é um dos limonoides mais importantes, mas apesar de estar presente em todas as partes da planta, encontra-se em maior concentração nas sementes (Patel *et al.*, 2016). Carneiro e colaboradores (2012), testaram a azadiractina *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e concluíram que esta não teve atividade anti*Leishmania*. Outros constituintes como a quercetina (da Silva *et al.*, 2012), o estigmasterol e o acetato de ergosterol (Venkatesan *et al.*, 2011), obtidos a partir de outras plantas, demonstraram ter potencial atividade contra *Leishmania* spp, incluindo *Leishmania infantum*, no entanto, estes compostos também foram identificados na composição fitoquímica de *A. indica* (Patel *et al.*, 2016).

Nas tabelas II e III estão descritos os ensaios realizados com extratos obtidos a partir do Neem e que foram testados contra *Leishmania* spp. Nesses estudos, os autores utilizaram as folhas, as cascas do caule e as sementes para a obtenção de extratos ou frações, tendo sido as folhas a parte mais comumente utilizada. Para a obtenção dos extratos utilizaram diversos solventes, nomeadamente água, metanol, etanol, hexano, diclorometano, acetato de etilo e clorofórmio. A concentração dos preparados variou consoante o tipo de ensaio e a formulação final do extrato. Os compostos de referência usados pelos autores nos ensaios foram fármacos habitualmente prescritos para o tratamento das várias formas de leishmaniose, dos quais se destacam o estibogluconato de sódio e a anfotericina B.

De um modo geral, os extratos obtidos com os diferentes solventes demonstraram atividade antiparasitária contra *Leishmania major* (Tahir *et al.*, 1998; Khalid *et al.*, 2005; Jumba *et al.*, 2015; Mans *et al.*, 2016), *Leishmania donovani* (Singh *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2013; Chouhan *et al.*, 2015; Dayakar *et al.*, 2015; Mans *et al.*, 2016) e *Leishmania amazonensis* (Carneiro *et al.*, 2012), que comprovaram o potencial anti*Leishmania* de *Azadirachta indica*.

Sendo *Leishmania infantum* o agente que constitui o principal risco para infeção zoonótica, e tendo em conta que ainda não existem relatos de estudos nesta espécie, o estudo da atividade anti*Leishmania* do Neem é auspicioso, uma vez que a planta demonstrou atividade antiparasitária contra *Leishmania donovani*, que é o agente etiológico da LV antroponótica.

Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* a extratos das folhas de Neem (*Azadirachta indica*)

Tabela II – Potencial anti-*Leishmania* de *Azadirachta indica* (Neem) contra *Leishmania* spp.

Referência	Parte da planta	Solvente/ Fração	Concentração	Espécie de <i>Leishmania</i>	Gold Standard	Resultado
(Tahir <i>et al.</i> , 1998)	Casca do caule	Metanol 80%	0,5; 5; 25; 50; 100 µg/mL	<i>Leishmania major</i> (promastigotas)	ND	A inibição do crescimento de promastigotas foi de 91% na concentração de 100 µg/mL. IC ₅₀ = 11,5 µg/mL
(Khalid <i>et al.</i> , 2004)	ND	Metanol	100 mg/mL	ND (amastigotas)	Pentostam® (Estibogluconato de Sódio)	83,3% (10/12) dos casos responderam ao tratamento, dos quais 33,33% apresentaram cicatrizaç�o completa das les�es e 50% apresentaram resposta parcial.
(Khalid <i>et al.</i> , 2005)	Folhas	Metanol 80%	31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL	<i>Leishmania major</i> (promastigotas)	Pentostam® (Estibogluconato de S�dio)	IC ₅₀ = 10,21 µg/mL
(Singh <i>et al.</i> , 2011)	Folhas Casca do caule	�gua destilada	0,001; 0,02; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL	<i>Leishmania donovani</i> (promastigotas e amastigotas)	Estibogluconato de S�dio e Anfotericina B	MEC = 0,1mg/mL O efeito anti- <i>Leishmania</i> contra amastigotas foi 1,9 vezes maior que o efeito contra promastigotas.
(Carneiro <i>et al.</i> , 2012)	Folhas Sementes	Etanol (Fra�es: hexano, diclorometano, acetato de etilo, �gua, clorof�rmio e metanol) Etanol (Fra�es: hexano, diclorometano, acetato de etilo e �gua)	Promastigotas: 0,78 - 400 µg/mL Amastigotas: 3,12 - 100 µg/mL	<i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotas e amastigotas)	Anfotericina B	Ap�s 72h de incubac�o das fra�es de extratos com promastigotas e amastigotas os valores de IC ₅₀ foram respetivamente: EtOH-I = 38 µg/mL; 9,8 µg/mL Hex-I = 8,5 µg/mL; ND CH ₂ Cl ₂ -I = 3,9 µg/mL; 1,1 µg/mL CHCl ₃ -c = 1,2 µg/mL; 0,6 µg/mL EtOAc-c = 1,4 µg/mL; NT EtOH-t = 2,7 µg/mL; 0,4 µg/mL CH ₂ Cl ₂ -t = 2,1 µg/mL; 0,6 µg/mL As restantes fra�es utilizadas foram inativas nas concentra�es estudadas. O fracionamento do extrato etan�lico aumentou a atividade anti- <i>Leishmania</i> , revelando-se 8 a 32 vezes mais t�xico para promastigotas e 15 a 72 vezes mais t�xico para amastigotas.
(Kaur <i>et al.</i> , 2013)	ND	�gua destilada	100 mg/kg (extrato de Neem isolado ou em combina�o com <i>Emblica officinalis</i>), 200 mg/kg (combina�o)	<i>Leishmania donovani</i> (amastigotas)	Estibogluconato de S�dio	A redu�o da carga parasit�ria foi significativamente maior nos ratinhos BALB/c tratados com <i>Emblica officinalis</i> em compara�o com os tratados com <i>A. indica</i> . A combina�o de <i>A. indica</i> e <i>Emblica officinalis</i> na dose de 200 mg/kg de peso corporal (cada), foi mais eficaz na redu�o da carga parasit�ria.

Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* a extratos das folhas de Neem (*Azadirachta indica*)

Tabela III – Potencial anti-*Leishmania* de *Azadirachta indica* (Neem) contra *Leishmania* spp (continuação).

Referência	Parte da planta	Solvente/ Fração	Concentração	Espécie de <i>Leishmania</i>	Gold Standard	Resultado
(Chouhan <i>et al.</i> , 2015)	Folhas	Hexano Etanol Água	2,05 - 500 µg/mL	<i>Leishmania donovani</i> (promastigotas e amastigotas)	Pentamidina	Os valores de IC ₅₀ para promastigotas e amastigotas foram respetivamente: EEF = 34 µg/mL; 17,66 µg/mL EES = 77,66 µg/mL; 24,66 µg/mL Pentamidina = 1,4 µg/mL; 0,87 µg/mL A fração de hexano da casca suprimiu inicialmente o crescimento parasitário, mas posteriormente verificou-se um aumento gradual na densidade celular. Nenhuma das outras frações causou declínio significativo na viabilidade do parasita.
(Dayakar <i>et al.</i> , 2015)	Folhas	Hexano Acetato de etilo Etanol Água	0; 1,8; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL	<i>Leishmania donovani</i> (promastigotas e amastigotas)	Miltefosina	Apenas a fração de acetato de etilo mostrou efeito anti- <i>Leishmania</i> , cujo IC ₅₀ foi de 52,4 µg/mL para promastigotas e 10 µg/mL para amastigotas. As frações de hexano, etanol e água foram consideradas ineficazes.
(Jumba <i>et al.</i> , 2015)	Folhas de <i>Azadirachta indica</i> e <i>Ricinus communis</i>	Metanol absoluto	3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µg/mL	<i>Leishmania major</i> (promastigotas e amastigotas)	Pentostam® (Estibogluconato de sódio) e Anfotericina B	Os valores de IC ₅₀ para promastigotas e amastigotas foram respetivamente: <i>A. indica</i> = 10,1 µg/mL; 11,5 µg/mL <i>Ricinus communis</i> = 25,5 µg/mL; 16,5 µg/mL Terapia combinada = 12,2 µg/mL; 9,0 µg/mL Pentostam® = 4,1 µg/mL; 6,5 µg/mL Anfotericina B = 5 µg/mL; 4,5 µg/mL
(Mans <i>et al.</i> , 2016)	Folhas	Água	15,625 - 500 µg/mL	- <i>Leishmania guyanensis</i> (promastigotas) - <i>Leishmania major</i> (promastigotas) - <i>Leishmania donovani</i> (promastigotas e amastigotas)	Anfotericina B	Os valores de IC ₅₀ para promastigotas das 3 espécies e amastigotas de <i>Leishmania donovani</i> foram respetivamente: <i>Leishmania guyanensis</i> >500 µg/mL <i>Leishmania major</i> = 187 µg/mL <i>Leishmania donovani</i> = 247 µg/mL; 451 µg/mL

ND: Não descrito

NT: Não testado

IC₅₀: Concentração inibitória para 50% das células parasitárias

MEC: Concentração mínima efetiva

EtOH-l: Extrato etanólico das folhas

Hex-l: Extrato etanólico das folhas fração de hexano

CH₂Cl₂-l: Extrato etanólico das folhas fração de diclorometano

CHCl₃-c: Fração de clorofórmio

EtOAc-c: Fração de acetato de etilo

EtOH-t: Extrato etanólico do tegumento

CH₂Cl₂-t: Extrato etanólico do tegumento fração de diclorometano

EEF: Extrato etanólico das folhas

EES: Extrato etanólico das sementes

Referências

- Abranches, P., Lopes, F., Silva, F., Ribeiro, M., & Pires, C. (1983). Kala-azar in Portugal. III. Results of a survey on canine leishmaniasis performed in the Lisbon region. Comparison of urban and rural zones. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, *58*(4), 307–315.
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *57*, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Álvares, D. (1910). Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Medicina Contemporanea* *13*, 90–91.
- Alzohairy, M. A. (2016). Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/7382506>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., ... Magill, A. (2017). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, *24*(7), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Bates, P. A. (1994). The Developmental Biology of *Leishmania* Promastigotes. *Experimental Parasitology*, *79*(2), 215–218. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1084>
- Campino, L., & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal, *23*(5), 859–864.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., ... Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, *11*(11), 1708–1714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x>
- Carneiro, S. M. P., Carvalho, F. A. A., Santana, L. C. L. R., Sousa, A. P. L., Neto, J. M. M., & Chaves, M. H. (2012). The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biological Research*, *45*(2), 111–116. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000200002>
- CDC. (2018). Leishmaniasis. Obtido 30 de Maio de 2019, de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/prevent.html>
- Chang, K.-P., Reed, S. G., McGwire, B. S., & Soong, L. (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica*, *85*(3), 375–390. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00238-3)
- Chaudhary, S., Kanwar, R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow, C., Sehgal, R., & Kanwar, J. R. (2017). Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00610>
- Chouhan, G., Islamuddin, M., Want, M. Y., Abdin, M. Z., Ozbak, H. A., Hemeg, H. A., ... Afrin, F. (2015). Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory

- potential and therapeutic cure *in vivo*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0788-3>
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189(2–4), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.028>
- da Silva, E. R., Maquiaveli, C. do C., & Magalhães, P. P. (2012). The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology*, 130(3), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.015>
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Veronica, J., Sundar, S., & Maurya, R. (2015). *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. *Experimental Parasitology*, 153, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.02.011>
- Desjardins, M., & Descoteaux, A. (1997). Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(12), 2061–2068. <https://doi.org/10.1084/jem.185.12.2061>
- DGAV. (2017). *Sanidade animal. Relatório 2010–2016*.
- DGAV. (2018). *ZOONOSES em Portugal Continental 2014 a 2017*. Obtido de https://www.dgv.min-agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=27801988&att_display=n&att_download=y
- EMA. (2016). *Letifend*. Obtido de http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/veterinary/medicines/003865/smops/Positive/vet_smop_000180.jsp&mid=WC0b01ac058008d7aa
- Gaspar, C. C., Augusto, G. F., Albuquerque, M. J., Nascimento, M. R. do, Vicêncio, P. O., & Nogueira, P. (2017a). *Doenças de declaração obrigatória 2013–2016. DGS (Vol. I–Portugal)*.
- Gaspar, C. C., Augusto, G. F., Albuquerque, M. J., Nascimento, M. R. do, Vicêncio, P. O., & Nogueira, P. (2017b). *Doenças de Declaração Obrigatória 2013 – 2016. DGS (Vol. II–Regiões)*.
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs Sandflies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34(2), 613–626.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>
- Gupta, S. C., Prasad, S., Tyagi, A. K., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2017). Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine*, 34, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.001>
- Hamdi, A., Bero, J., Beaufay, C., Flamini, G., Marzouk, Z., Vander Heyden, Y., & Quetin-Leclercq, J. (2018). *In vitro* antileishmanial and cytotoxicity activities of essential oils from *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves, stems and aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2128-6>
- Iqbal, H., Ishfaq, M., Wahab, A., Abbas, M. N., Ahmad, I., Rehman, A., & Zakir, M. (2016). Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60975-6](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60975-6)
- Jumba, B. N., Anjili, C. O., Makwali, J., Ingonga, J., Nyamao, R., Marango, S., ... Khayeka-Wandabwa, C. (2015). Evaluation of leishmanicidal activity and cytotoxicity of *Ricinus communis* and *Azadirachta indica* extracts from western Kenya: *in vitro* and *in vivo* assays. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1605-y>

- Kaur, S., Kaur, G., Sachdeva, H., & Kaur, J. (2013). *In vivo* evaluation of the antileishmanial activity of two immunomodulatory plants, *Emblica officinalis* and *Azadirachta indica* in Balb/c mice. *International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine*, 3(1), 1066–1079.
- Khalid, F. A., Abdalla, N. M., MOHAMED, H. E. O., Toum, A. M., Magzoub, M. M. A., & ALI, M. S. (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis with some local Sudanese plants (Neem, Garad & Garlic). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28(3), 129–132.
- Khalid, F. A., Abdalla, N. M., Mohamed, H. E. O., Toum, A. M., Magzoub, M. M. A., & Ali, M. S. (2005). *In vitro* assessment of anti-cutaneous leishmaniasis activity of some Sudanese plants. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 29(1), 3–6.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., ... Schönian, G. (2008). Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(7), e261. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000261>
- Lamotte, S., Späth, G. F., Rachidi, N., & Prina, E. (2017). The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005480>
- Leprohon, P., Fernandez-Prada, C., Gazanion, É., Monte-Neto, R., & Ouellette, M. (2015). Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.09.005>
- Lindoso, J., Moreira, C., Cunha, M., & Queiroz, I. T. (2018). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care, Volume 10*, 193–201. <https://doi.org/10.2147/HIV.S143929>
- Maia, C., & Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, 213(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>
- Mans, D. R. A., Beerens, T., Magali, I., Soekhoe, R. C., Schoone, G. J., Oedairadjsingh, K., ... Schallig, H. D. F. H. (2016). *In vitro* evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, 180, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.012>
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107(1), 7–14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Millán, J., Ferroglio, E., & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, 113(6), 2005–2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., ... Oliva, G. (2017). Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 33(9), 718–730. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005>
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405.
- No, J. H. (2016). Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Tropica*, 155, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.016>
- OIE. (2018). Leishmaniasis. Em *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (pp. 491–502).
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., ... Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of

- leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1192–1198. <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1192>
- OMS. (2010). *Control of the leishmaniasis*. World Health Organization technical report series. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1766>
- OMS. (2015). *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases*. <https://doi.org/10.1007/s00247-015-3337-5>
- OMS. (2017a). *Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases (Vol. 4)*. <https://doi.org/WHO/HTM/NTD/2017.01>
- OMS. (2017b). *Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region*. (L. Gradoni, R. López-Vélez, & M. Mokni, Eds.).
- OMS. (2018). Surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region, 2016. *Weekly epidemiological record*, 93(40), 521–540. Obtido de https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9340/en/
- OMS. (2019). Leishmaniasis. Obtido 30 de Maio de 2019, de <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10), 925–932. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*, 29(7), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>
- Ouellette, M., Drummel-Smith, J., & Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7(4–5), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.002>
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>
- Patel, S. M., Venkata, K. C. N., Bhattacharyya, P., Sethi, G., & Bishayee, A. (2016). Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. Em *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 40, pp. 100–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.002>
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiology*, 10(1), 111–129. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15(10), 1–11.
- Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
- Rodrigues, I. A., Mazotto, A. M., Cardoso, V., Alves, R. L., Amaral, A. C. F., Silva, J. R. D. A., ... Vermelho, A. B. (2015). Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/835910>
- Sádlová, J., & Volf, P. (1999). Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, 118(5), 455–460.
- Saleem, S., Muhammad, G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. A. (2018). A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1241–1272. <https://doi.org/10.1002/ptr.6076>
- Siddiqui, S. (1942). Siddha medicine. *Curr. Sci.*, 11, 278–279.

- Singh, S. K., Bimal, S., Narayan, S., Jee, C., Bimal, D., Das, P., & Bimal, R. (2011). *Leishmania donovani*: Assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniasis endemic area of Bihar, India. *Experimental Parasitology*, 127(2), 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.014>
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Tahir, A. El, Ibrahim, A. M., Satti, G. M. H., Theander, T. G., Kharazmi, A., & Khalid, S. A. (1998). The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 12(8), 576–579. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199812\)12:8<576::AID-PTR354>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199812)12:8<576::AID-PTR354>3.0.CO;2-#)
- Tahir, A. El, Satti, G. M. H., & Khalid, S. A. (1999). Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 227–233. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00129-9)
- Tiwari, R., Verma, A. K., Chakrabort, S., Dhama, K., & Singh, S. V. (2014). Neem (*Azadirachta indica*) and its Potential for Safeguarding Health of Animals and Humans: A Review. *Journal of Biological Sciences*, 14(2), 110–123. <https://doi.org/10.3923/jbs.2014.110.123>
- Venkatesan, S. K., Saudagar, P., Shukla, A. K., & Dubey, V. K. (2011). Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 3(3), 217–231. <https://doi.org/10.1007/s12539-011-0101-x>
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. C., & Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, 18(6), 272–278. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02289-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02289-4)
- Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discovery Today*, 22(10), 1516–1531. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.004>

CAPÍTULO II

Este capítulo consiste no relato de um ensaio laboratorial *in vitro* para avaliação da atividade dos extratos das folhas de *Azadirachta indica* (Neem) contra *Leishmania infantum*. O capítulo foi redigido de acordo com as instruções de publicação na *Revista de Fitoterapia* com finalidade de submissão.

Avaliação *in vitro* da sensibilidade de *Leishmania infantum* a extratos das folhas de Neem (*Azadirachta indica*)

Resumo

A leishmaniose é uma parasitose disseminada um pouco por todo o Mundo. A *Leishmania infantum* (*L. infantum*) é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Homem, sendo o cão o principal reservatório e hospedeiro. A doença representa um grave problema veterinário e de saúde pública. As limitações das terapias farmacológicas desafiam a procura de alternativas mais eficazes e seguras. A *Azadirachta indica* (*A. indica*) ou Neem, é uma planta promissora para o arsenal terapêutico contra a doença. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade anti*Leishmania* de extratos das folhas de Neem em promastigotas de *L. infantum*. Os extratos metanólicos obtidos por moagem em moinho (MM) e por moagem criogénica com azoto líquido (MAZ) revelaram atividade anti*Leishmania*, cujos valores de IC₅₀ foram 82,50 µg/mL e 77,97 µg/mL, respetivamente. Os extratos aquosos não revelaram atividade nas concentrações estudadas.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, promastigotas, leishmaniose visceral, atividade anti*Leishmania*, *in vitro*, *Azadirachta indica*, citotoxicidade.

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease spread all over the world. *Leishmania infantum* (*L. infantum*) is the etiological agent of human visceral leishmaniasis (LV), been dog its main reservoir and host. The disease represents a serious veterinary and public health problem. The limitations of pharmacological therapies challenge the search for safe and more effective alternatives. *Azadirachta indica* (*A. indica*) or Neem, is a promising plant for the therapeutic arsenal against the disease. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the anti*Leishmania* activity of Neem leaf extracts in *Leishmania infantum* promastigotes. The methanolic extracts obtained by milling in the grinder (MM) and cryogenic milling with liquid nitrogen (MAZ), showed anti*Leishmania* activity, with IC₅₀ values of 82,50 µg/mL and 77,97 µg/mL, respectively. The aqueous extracts showed no activity at the concentrations studied.

Keywords: *Leishmania infantum*, promastigotes, visceral leishmaniasis, anti*Leishmania* activity, *in vitro*, *Azadirachta indica*, cytotoxicity.

Introdução

A leishmaniose, é uma doença parasitária, causada por protozoários digenéticos do género *Leishmania* (família Trypanosomatidae), transmitida a hospedeiros vertebrados através da picada de flebotomíneos fêmeas infetados.^{1,2} É endémica nas regiões tropicais, subtropicais e bacia do Mediterrâneo, abrangendo mais de 98 países.³ Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas das áreas endémicas estejam em risco de contrair a infeção e que surjam anualmente, 0,7 a 1 milhão de novos casos e 26.000 a 65.000 mortes.⁴ Nas duas últimas décadas, a leishmaniose expandiu a sua distribuição geográfica, representando um grave problema de saúde pública e uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, devido à morbilidade e mortalidade associadas, principalmente nos países subdesenvolvidos.⁵

Atualmente, são conhecidas 54 espécies do género *Leishmania* das quais, sabe-se que, 31 parasitam mamíferos e 21 são patogénicas para o Homem.^{1,6} A LV, é a forma mais grave e fatal da doença, com uma taxa de mortalidade de 75% a 95% se não for tratada.⁷ Caracteriza-se pela infeção de macrófagos do sistema reticuloendotelial, atingindo principalmente os tecidos do fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos.^{2,3} Os agentes etiológicos são a *Leishmania donovani* (*L. donovani*) e *L. infantum*.⁸

A transmissão de *L. infantum* é zoonótica e ocorre no Médio Oriente, Ásia Central, China, nas regiões mais secas da América Latina e regiões do Mediterrâneo.⁷ O zimodeme mais prevalente e responsável pela LV na Europa é o MON-1.⁹ A transmissão autóctone ocorre em Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia, Malta, Chipre, Croácia, Albânia, Bulgária e Turquia, mas o aumento do movimento internacional de viajantes, resultou na importação de casos de leishmaniose para países não endémicos.¹⁰ A alta prevalência de portadores assintomáticos no Sul da Europa sugere que esta espécie é uma ameaça latente.¹¹

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência anual de LV causada por *L. infantum* nas regiões do mediterrâneo é de 1.100 a 1.900 casos.^{3,12} A coinfeção de LV com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e/ou síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), favorece a evolução da doença, contribuindo para o aumento de taxas de recaída e de mortalidade, representando um problema clínico complexo.¹³

O principal reservatório e hospedeiro de *L. infantum* é o cão, o que complica o controlo da doença. A leishmaniose canina (LCan) é complexa, com vários graus de gravidade e vasto espectro de manifestações clínicas inespecíficas, similares à forma visceral humana, conjuntamente com lesões cutâneas.^{14,15} Estima-se que na Europa, cerca de 700 pessoas sejam afetadas pela enfermidade anualmente.¹⁶ Apesar de não ser clara a relação entre a prevalência da doença no cão e no Homem, a presença de cães infetados possui um papel determinante na manutenção da endemia.¹⁷

A deteção de casos assintomáticos e o diagnóstico precoce são cruciais para reduzir a morbilidade e mortalidade da doença, quer no Homem, quer no cão, bem como reduzir a carga parasitária, monitorizar a transmissão e a disseminação da doença. Embora tratável e curável, a leishmaniose está dependente de uma resposta imunocompetente, porque os fármacos instituídos não eliminam o parasita, pelo que não se pode descartar a hipótese de recaída em caso de imunossupressão.^{3,18} Desde 1940, o tratamento das leishmanioses

têm dependido de antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio), no entanto surgiram outras opções terapêuticas tais como: a anfotericina B (ANF-B), a pentamidina, a miltefosina e a paramomicina.^{3,19}

Na Europa, as diretrizes da OMS para tratamento da LV incluem a ANF-B lipossômica como fármaco de primeira linha e os antimoniais pentavalentes como segunda linha.^{12,20} No cão, a OMS desencorajou o uso de ANF-B de forma a evitar a eventual ocorrência de resistências. A combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol, é o protocolo terapêutico mais comum na LCan e é considerado a primeira linha de tratamento.^{18,21} Atualmente, na Europa já estão disponíveis 2 vacinas para administração em canídeos, mas ainda não existem vacinas ou quimioprolifáticos para o Homem, devido à variabilidade de *Leishmania* spp.^{18,22}

Atualmente, as terapêuticas aplicadas no tratamento de LV estão fortemente comprometidas com o aparecimento de resistências, principalmente os antimoniais pentavalentes onde na Índia e no Nepal a resistência é superior a 65%.¹⁹ A evolução de fenótipos de *Leishmania* spp. resistentes a medicamentos tem sido associada à plasticidade do genoma, influenciada com a exposição aos fármacos.²³ Outras limitações do arsenal terapêutico comumente utilizado englobam perfis severos de toxicidade e falha terapêutica.^{19,20,24}

A emergência e reemergência da doença gera a necessidade de tratamentos mais eficazes e seguros, que têm vindo a estimular a investigação de alternativas terapêuticas como as de origem natural. Os produtos naturais, usados tradicionalmente na medicina popular para prevenir e tratar inúmeras doenças, estão a ser, cada vez mais, alvos de pesquisa e de estudos em todo o Mundo, uma vez que são fontes de constituintes bioativos, com várias propriedades farmacológicas, incluindo atividade antiparasitária.²⁵

A *Azadirachta indica*, conhecida popularmente por árvore de Neem ou Nim, foi descoberta pela primeira vez na Índia há mais de 4.500 anos.²⁶ Pertence à família Meliaceae, e é abundante nas regiões tropicais e subtropicais, onde é popularmente usada. Cada parte da árvore é rica em diversos fitoquímicos com múltiplos benefícios medicinais, sendo mencionada como “*village pharmacy*” ou “árvore do século XXI”.²⁶ Os terpenoides, esteroides, flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, proteínas, ácidos gordos e ésteres, são exemplos de alguns grupos de compostos bioativos existentes na planta.^{26,27} Os triterpenoides distinguem-se por serem a classe principal, nos quais se incluem os limonoides, como por exemplo: azadiractina, azadiradiona, nimbolida, nimbina, salanina ou gedunina, que se encontram em abundância nas folhas e nos frutos e são altamente solúveis em solventes alcoólicos.^{26,28} Os extratos das folhas possuem propriedades imunomoduladoras, inseticidas, antisséticas, anticancerígenas, antivíricas, antifúngicas e antiprotozoárias.²⁹ A atividade antiprotozoária de *A. indica* revelou ser eficaz contra os agentes patogénicos *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Leishmania*.²⁷ Extratos obtidos de várias partes da árvore demonstraram atividade antiparasitária *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania major*,^{30–33} *Leishmania donovani*,^{33–36} e *Leishmania amazonensis*.³⁷

Tendo em conta que o Neem revelou atividade contra algumas espécies de *Leishmania* e uma vez que não existem relatos de estudos em *Leishmania infantum*, a realização deste estudo tornou-se pertinente. O objetivo foi avaliar a atividade anti-*Leishmania* de extratos aquosos e metanólicos das folhas de *Azadirachta indica* em promastigotas de *L. infantum*, obtidos por duas técnicas: moagem por moíno e moagem criogénica.

Material e Métodos

Preparação dos extratos das folhas de Neem

As folhas de *Azadirachta indica* foram importadas da Índia (Umalaxmi Organics Pvt. Ltd.), no estado seco. Estas foram trituradas grosseiramente por duas técnicas isoladas: uma por moagem com moíño (Krupps® KM 75, 220V) durante 30 segundos e outra por moagem criogénica com azoto líquido em almofariz de ferro (a técnica de moagem criogénica baseou-se na utilizada por Castoldi e colaboradores (2017),³⁸ com algumas alterações). Os extratos foram obtidos com base no método utilizado por Tahir e cooperantes (1998).³⁰ 5g de pó de cada técnica foram macerados com água durante 1 dia e com metanol (MeOH) 80% (V/V) durante 7 dias, na relação massa: solvente (1:20), no escuro e à temperatura ambiente. Foram realizadas 3 extrações de cada mistura. Após maceração, as misturas foram filtradas. As misturas metanólicas foram concentradas num evaporador rotativo (VWR®). Posteriormente, todas as misturas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

Os extratos metanólicos (MM e MAZ), foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a 400 mg/mL, servindo de solução *stock* para todos os ensaios. As soluções *stock* de ambos foram conservadas a -20°C.

As soluções *stock* dos extratos aquosos obtidos por moagem com moíño (AM) e por moagem criogénica com azoto líquido (AAZ) foram preparadas no dia dos ensaios.

Manutenção dos promastigotas de *Leishmania infantum*

A manipulação dos promastigotas seguiu as condições de biossegurança que a espécie exige como agente biológico do grupo de risco 2, recorrendo ao ambiente assético em câmara de fluxo laminar.³⁹ Foram utilizados promastigotas da espécie *Leishmania infantum* (MHOM/PT/89/IMT 151) cedidos gentilmente pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL).

Os parasitas foram cultivados segundo uma adaptação à técnica de cultivo utilizada por Dayakar e investigadores (2015).³⁶ O meio RPMI 1640 incorporado comercialmente com L-Glutamina (BioWhittaker®) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Biowest®) inativado, HEPES 1M (Fisher Bioreagents®), penicilina 50 U/mL e estreptomicina 50 U/mL, constituiu o meio de cultura completo (meio RPMI completo).

Os promastigotas foram inoculados em frasco de cultura de 25 cm² com meio de cultura completo, pH 7,4 e incubados a 26°C. A manutenção da cultura foi garantida a cada 3-4 dias, com monitorização em microscópio invertido. Efetuaram-se alíquotas para utilizações posteriores, em meio de cultura completo com 10% de DMSO, segundo o protocolo de Castro (2016),⁴⁰ que foram armazenadas a -80°C.

Determinação da curva de crescimento

A caracterização do crescimento parasitário *in vitro* é fundamental para a determinação da fase exponencial (*Log*) de crescimento e assim definir o tempo de incubação dos promastigotas de *Leishmania infantum* com os extratos. Para determinação da curva de crescimento, aplicou-se o método utilizado por Castro (2016),⁴⁰ em que 10^6 parasitas/mL foram inoculados em frasco de cultura de 25 cm² com meio de cultura completo, em triplicado e incubados a 26°C durante 5 dias. O crescimento parasitário das culturas foi avaliado por contagem diária do número de parasitas em câmara de Neubauer, ao microscópio ótico na ampliação de 400x. A densidade de promastigotas em suspensão foi expressa em parasitas/mL. Tratando-se de células viáveis e com mobilidade, quando em suspensão, a fixação dos parasitas foi feita com paraformaldeído 4% em tampão fosfato salino (PBS), na preparação das amostras para contagem.

Avaliação *in vitro* da atividade anti*Leishmania*

A preparação dos parasitas para os ensaios de viabilidade celular foi elaborada segundo a técnica de Et-Touys e colaboradores (2016).⁴¹ Os promastigotas na fase *Log* de crescimento foram quantificados em câmara de Neubauer de forma a ajustar a concentração parasitária para 10^6 parasitas/mL. Estes foram cultivados em *ependorfs* com meio de cultura completo.

Os extratos aquosos (AM e AAZ) foram solubilizados em água estéril para obter a solução *stock* de 20 mg/mL e posteriormente diluídos em série em meio RPMI completo. Uma alíquota das soluções *stock* de MM e MAZ, foi solubilizada em meio RPMI completo para obter as soluções mãe a 20 mg/mL, e posteriormente foram diluídas em série no mesmo meio. Os extratos foram adicionados de forma a obter as concentrações finais: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL (DMSO 1%) e incubados por 72 horas a 26°C.

A viabilidade celular foi avaliada após incubação, usando o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (SIGMA®). O ensaio MTT, é um ensaio colorimétrico descrito por Mosmann (1983),⁴² que se baseia na redução do tetrazólio em cristais de *formazan* de cor púrpura pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis. O procedimento para o ensaio MTT baseou-se no descrito por Castro (2016).⁴⁰ Após incubação, o conteúdo dos *ependorfs* foi centrifugado (1500 rpm, durante 10 minutos a 20°C) para remover o sobrenadante e adicionar 200 µL da solução de PBS-Glicose (1:1) com MTT na concentração final de 0,5 mg/mL. Os *ependorfs* foram incubados durante 3-4 horas e centrifugados novamente, com posterior remoção do sobrenadante. Os cristais de *formazan* foram solubilizados em 100 µL de DMSO puro e transferidos, respetivamente, para uma microplaca (Thermo Fisher Scientific ®) de 96 poços de fundo plano. A absorvância foi lida no comprimento de onda de 550 nm num leitor de microplacas (Dynex Technologies ® MXR).

Foram realizados 3 ensaios independentes para cada grupo de extratos. Cada ensaio independente foi executado com 6 concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL), com 4 réplicas cada, para garantir a reprodutibilidade e validade dos métodos utilizados e a coerência dos resultados. A ANF-B foi usada como controlo positivo e o controlo negativo consistiu na suspensão de promastigotas com adição de DMSO 1%. O branco utilizado foi o DMSO puro.

Análise estatística

A percentagem de inibição celular para o cálculo da concentração inibitória para 50% dos promastigotas (IC₅₀) foi determinada com base na seguinte fórmula:⁴¹

$$\% \text{ de inibição celular} = 100\% - \left(\frac{\text{Absorvância dos poços de teste}}{\text{Absorvância do controlo}} \times 100\% \right)$$

A atividade anti*Leishmania* foi expressa a partir do IC₅₀, cujos valores foram calculados usando o *software* GraphPad Prism® 8 e o efeito anti*Leishmania* dos extratos foi estudado por análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Caraterização do crescimento celular

As condições para os ensaios de viabilidade celular com promastigotas de *Leishmania infantum* foram determinadas com base na caracterização do crescimento celular (figura 1).

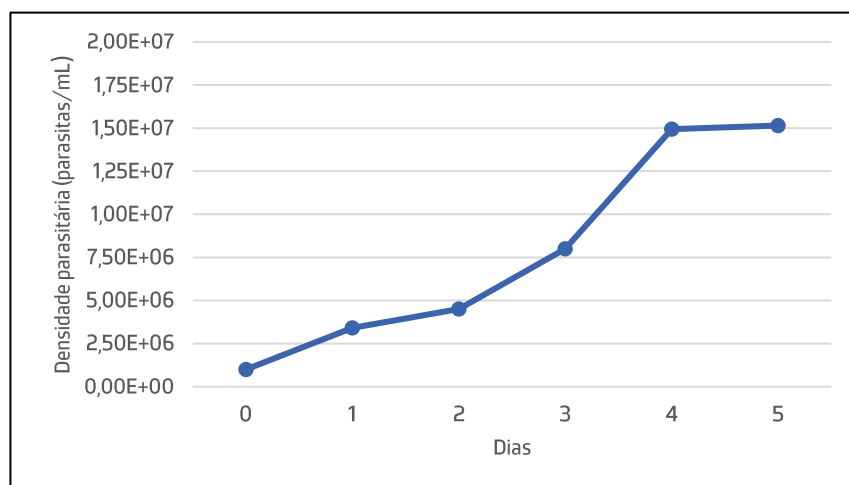


Figura 1| Curva de crescimento dos promastigotas de *Leishmania infantum*.

Os resultados apresentados correspondem a uma das amostras mais representativas do crescimento parasitário. O inóculo para obtenção da curva de crescimento foi 10^6 parasitas/mL. Pode verificar-se que na fase inicial da cultura, entre o dia zero e o 2º dia, a densidade parasitária foi reduzida e de crescimento lento. Entre o 3º e 4º dia de incubação, ocorreu a fase *Log* de crescimento, com 8×10^6 e $1,50 \times 10^7$ parasitas/mL, respectivamente, de modo que a exposição dos promastigotas aos extratos de *A. indica* foi realizada durante 72h.

Avaliação *in vitro* da atividade anti*Leishmania*

As pesquisas debruçadas na descoberta de novos fármacos pretendem identificar fontes naturais ricas em propriedades terapêuticas contra a leishmaniose, devido ao aparecimento de resistências, perfis severos de toxicidade e falência terapêutica, sobretudo nas áreas endêmicas onde o uso de fórmulas farmacêuticas antigas tem sido exaustivo por falta de alternativas.²⁴ É ambicionado encontrar compostos que confiram uma resposta imunitária protetora, duradoura, equilibrada e direcionada ao agente etiológico (atuando no seu genoma ou em alvos específicos, como por exemplo enzimas ou proteínas), objetivando que interfiram na viabilidade e infetividade parasitária.^{18,19}

O efeito anti*Leishmania* dos extratos vegetais na redução da viabilidade celular dos parasitas, pode resultar de alterações morfológicas ou metabólicas ou por indução de morte celular.¹⁹ Neste ensaio, estudou-se o efeito anti*Leishmania in vitro* de extratos aquosos e metanólicos obtidos a partir das folhas de *Azadirachta indica*, usando o método colorimétrico MTT. Este método permite avaliar a citotoxicidade de compostos através da viabilidade celular. Os promastigotas viáveis e metabolicamente ativos, reduzem o tetrazólio em cristais de *formazan* de cor púrpura através de enzimas mitocondriais, servindo como um indicador da viabilidade celular. Quando mortos ou inviáveis, o tetrazólio não é reduzido. Para promastigotas na fase *Log* de crescimento, é presumível que a quantidade de *formazan* seja diretamente proporcional ao número de promastigotas viáveis metabolicamente ativos. Após solubilização dos cristais com DMSO, estes absorvem na região da luz visível, permitindo quantificar o número de parasitas viáveis através da medição da sua absorvância. Realça-se que o MTT é um marcador que reflete o metabolismo celular viável e não especificamente a proliferação celular.^{42,43}

Na tabela I, estão descritos os valores dos IC_{50} dos extratos estudados, cujos dados correspondem à média \pm desvio-padrão de 3 ensaios independentes para cada um deles. Os extratos aquosos (AM e AAZ) não tiveram atividade contra promastigotas de *Leishmania infantum* nas concentrações estudadas e por isso o IC_{50} não foi determinado (ND). A ausência de atividade anti*Leishmania* de AM e AAZ está de acordo com os resultados mencionados por Chouhan *et al.* (2015)³⁵ e Dayakar *et al.* (2015),³⁶ que testaram extratos de folhas de Neem em *Leishmania donovani*, ao contrário de Singh *et al.*, 2015,³⁴ cujos extratos das folhas e cascas do caule demonstraram ser ativos para a mesma espécie. De acordo com o *American National Cancer Institute* (NCI), um extrato bruto é considerado altamente citotóxico quando $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, moderadamente

citotóxico quando $IC_{50} = [21 - 200] \mu\text{g/mL}$, fracamente citotóxico quando $IC_{50} = [201 - 500] \mu\text{g/mL}$ e não citotóxico quando $IC_{50} > 501 \mu\text{g/mL}$.⁴⁴ Mans e colaboradores (2016)³³ referiram que os extratos aquosos das folhas foram moderadamente citotóxicos para promastigotas de *Leishmania major* ($IC_{50} = 187 \mu\text{g/mL}$) e fracamente citotóxicos para *Leishmania donovani* ($IC_{50} = 247 \mu\text{g/mL}$) e não citotóxicos para *Leishmania guyanensis* ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$).

Tabela I – Valores de IC_{50} dos extratos das folhas de *Azadirachta indica* contra promastigotas de *Leishmania infantum* após 72h de exposição.

Extratos	$IC_{50} (\mu\text{g/mL}) \pm \text{D.P}$
MM	82,50 ± 9,76
AM	ND
MAZ	77,97 ± 5,19
AAZ	ND
ANF-B	0,24 ± 0,16

IC_{50} : Concentração inibitória para 50% dos promastigotas

D.P: Desvio-Padrão

ND: Não Determinado

MM: Extrato Metanólico obtido por moagem com Moínho

AM: Extrato Aquoso obtido por moagem com Moínho

MAZ: Extrato Metanólico obtido por moagem criogénica com Azoto líquido

AAZ: Extrato Aquoso obtido por moagem criogénica com Azoto líquido

ANF-B: Anfotericina B

Os extratos metanólicos (MM e MAZ) revelaram-se ativos contra os promastigotas de *Leishmania infantum* em todas as concentrações, as quais manifestaram uma relação dose-dependente na viabilidade celular. MM e MAZ apresentaram-se moderadamente citotóxicos, cujos valores de IC_{50} foram $82,50 \mu\text{g/mL}$ e $77,97 \mu\text{g/mL}$, respetivamente. Estes resultados diferem um pouco das conclusões de Khalid *et al.* (2005)³¹ e Jumba *et al.* (2015),³² cujos extratos metanólicos das folhas foram altamente citotóxicos contra *Leishmania major*, embora os primeiros tenham usado MeOH 80% (V/V) ($IC_{50} = 10,21 \mu\text{g/mL}$) e os segundos MeOH absoluto ($IC_{50} = 10,1 \mu\text{g/mL}$). Estudos com extratos etanólicos das folhas também revelaram efeito moderadamente citotóxico contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani*.^{35,37}

As discrepâncias entre os nossos resultados e os da literatura podem derivar de fatores como: o estado do material vegetal, quantidade e tipo de compostos bioativos existentes nas partes da planta e nos extratos obtidos, o solvente, a espécie de *Leishmania*, a técnica extrativa e o ensaio de avaliação da viabilidade celular.³² No que diz respeito à técnica extrativa, a moagem criogénica, com recurso ao azoto líquido, é um método que envolve o congelamento da matéria vegetal a temperaturas inferiores a 0°C, aumentando a fragilidade do material. Ao aplicar forças de alto impacto sobre ele, os cristais de gelo exercem pressão nas estruturas celulares, quebrando-as rapidamente, aumentando a área de exposição das células e dos compostos intracelulares existentes.³⁸ Este método distingue-se por ser muito eficiente, ao garantir uma melhor homogeneidade do material vegetal, sem perda de componentes e conservação dos mesmos. Ao contrário, os pulverizadores convencionais, como o moínho, não destroem todas as paredes celulares, para além de gerarem calor durante o processo de moagem, que pode causar degradação dos constituintes

bioativos mais sensíveis.⁴⁵ No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no efeito anti-*Leishmania* entre os extratos MM e MAZ ($p > 0,05$).

No que diz respeito aos solventes utilizados neste estudo, as características químicas da água são diferentes das do MeOH, o que torna os extratos AM e AAZ quimicamente diferentes dos extratos MM e MAZ. A árvore do Neem apresenta uma variedade de compostos fitoquímicos, no entanto, estes possuem uma baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em solventes orgânicos, como álcoois. Uma extração mais concentrada em constituintes bioativos presentes na *Azadirachta indica*, é garantida através de uma técnica extrativa com álcool, cujo rendimento é 50 vezes mais concentrado que a extração com água.²⁸ Deste modo, pode explicar-se a ausência de efeito dos extratos AM e AAZ na viabilidade celular dos promastigotas de *Leishmania infantum* e o efeito moderadamente citotóxico dos extratos MM e MAZ.

Vários limonóides existentes na *Azadirachta indica* foram reconhecidos *in vitro* pelas suas propriedades antimaláricas contra *Plasmodium falciparum*.⁴⁶ A azadiractina é um dos limonoides mais importantes, mas apesar de estar presente em todas as partes da planta, encontra-se em maior concentração nas sementes.²⁶ Carneiro e colaboradores (2012),³⁷ testaram a azadiractina *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e demonstrou não ter atividade. Outros constituintes como a quercetina,⁴⁷ o estigmasterol e o acetato de ergosterol,⁴⁸ obtidos a partir de outras plantas, demonstraram ter potencial atividade contra *Leishmania* spp, incluindo *Leishmania infantum*, no entanto, estes compostos também foram identificados na composição fitoquímica de *A. indica*,²⁶ colocando-se a possibilidade de serem responsáveis pela redução da viabilidade celular dos extratos.

Embora o resultado positivo de um teste de triagem não possa ser considerado indicador da potencial ação dos extratos, a avaliação da atividade dos mesmos em amastigotas é um passo necessário e fundamental para averiguar a atividade *in vitro* com a possível eficácia *in vivo*.⁴⁹ Por isso, e tendo em conta que extratos MM e MAZ testados neste estudo demonstraram ser moderadamente citotóxicos para promastigotas de *Leishmania infantum*, o próximo passo é incentivado, com aplicação dos mesmos ou de outros extratos de *A. indica* em amastigotas e a realização de ensaios de citotoxicidade para as células animais e humanas.

O estudo da toxicidade dos extratos é um tópico crucial na descoberta de alternativas para o tratamento da leishmaniose. Embora a *Azadirachta indica* seja uma planta versátil e segura, dentro do intervalo de segurança, os seus constituintes bioativos poderão revelar-se tóxicos.⁵⁰ Ensaios realizados em *L. donovani*, revelaram que os extratos aquosos das folhas e cascas do caule foram mais eficazes nas formas amastigotas do que em promastigotas, cuja resposta de morte foi 1,90 vezes maior. Nestes mesmos ensaios, o Neem apresentou-se menos tóxico para as células mononucleares face a outras plantas usadas no estudo, no entanto, também se revelou mais tóxico do que as restantes.³⁴ Segundo Carneiro e colaboradores (2012),³⁷ o fracionamento dos extratos da planta potencializa a atividade anti-*Leishmania*, mostrando-se mais eficazes contra as formas amastigotas do que para promastigotas de *Leishmania amazonensis*, por garantir a obtenção de frações mais ativas e com baixa toxicidade para os macrófagos. Outra forma de aumentar a atividade anti-*Leishmania* e reduzir a citotoxicidade dos compostos bioativos para as células animais e humanas, poderá ser a combinação de extratos de plantas, tal como descrito por Jumba *et al.* (2015),³² cuja combinação dos

extratos metanólicos das folhas de *Azadirachta indica* e *Ricinus communis* foram mais eficazes contra amastigotas de *Leishmania major* do que os extratos em monoterapia, sugerindo que a combinação das plantas têm efeitos sinérgicos no tratamento da leishmaniose. Os autores também referiram que a citotoxicidade da terapia combinada para os macrófagos foi inferior à dos fármacos de referência utilizados nos ensaios (pentostam® e ANF-B).

As formas promastigotas e amastigotas diferem na sua morfologia e bioquímica, por isso, a resposta aos extratos são frequentemente diferentes. Estudos de comparação da eficácia de compostos iguais em ambas as formas parasitárias concluíram que as formas promastigotas manifestam maior sensibilidade quando comparados com as formas amastigotas. Essa suscetibilidade pode relacionar-se com as diferenças morfológicas e bioquímicas, que nos amastigotas revelam ser mais complexas, e com o ambiente em que se encontram. Portanto, os resultados de ensaios *in vitro* concebidos em amastigotas, correlacionam-se mais intimamente com os resultados *in vivo*, cujas condições são mais próximas da realidade clínica da doença.¹⁹

Conclusão

A LCan e consequentemente a LV, são realidades endêmicas na região mediterrânica que justificam a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas para controlar a infeção. A incubação lenta e crónica, são um grande desafio clínico no diagnóstico e tratamento, ainda mais quando não existe uma vacina disponível para o Homem. Embora se consiga diminuir a carga parasitária e atenuar as manifestações clínicas, os regimes terapêuticos instituídos não garantem a cura da doença, para não falar da consequente resistência e toxicidade aos mesmos. Portanto, o estudo de alternativas farmacológicas é imprescindível para aumentar o arsenal terapêutico contra a doença.

Neste ensaio, os extratos metanólicos das folhas de Neem obtidos através da moagem com moínho e por moagem criogénica com azoto líquido, demonstraram ter atividade anti*Leishmania* em promastigotas de *Leishmania infantum*, ao contrário dos extratos aquosos (cujo potencial não deve ser rejeitado). Embora se tenha recorrido a duas técnicas de pulverização diferentes, o efeito dos extratos MM e MAZ foi moderadamente citotóxico, mas não houve diferença estatisticamente significativa no efeito anti*Leishmania* ($p > 0,05$).

Os nossos resultados confirmam as propriedades anti*Leishmania* da planta nesta espécie, revelando o seu potencial na constituição de alternativas farmacológicas contra a doença no Homem e no cão. Por isso, está lançado o ponto de partida para aprofundar o estudo de *Azadirachta indica* em ensaios *in vitro* e *in vivo* com amastigotas.

Paralelamente, os ensaios futuros deverão proceder à caracterização fitoquímica dos extratos obtidos por moagem criogénica com azoto líquido; estudar o mecanismo de ação desses constituintes bioativos; avaliar a citotoxicidade dos extratos em células animais e humanas, bem como testar extratos de outras partes da planta. Será também interessante examinar o efeito sinérgico de extratos obtidos a partir de outras plantas,

por exemplo com atividade imunomoduladora para ultrapassar a imunossupressão causada pela infecção, combinando-os com extratos do Neem.

Em suma, os extratos de *Azadirachta indica* revelaram ter efeito auspicioso contra promastigotas de *Leishmania infantum*, se associados a baixa citotoxicidade para as células animais e humanas, são potenciais alternativas para a produção de fórmulas farmacológicas mais eficazes e seguras, que poderão ultrapassar as limitações da terapia convencional, nomeadamente as resistências, a falha terapêutica e a toxicidade associadas.

Agradecimentos

Este estudo recebeu o apoio da empresa Bio4Life4You, à qual estamos gratos por suportar os custos dos consumíveis necessários. Os autores agradecem à Professora Doutora Lenea Campino da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL) por ceder gentilmente a estirpe *Leishmania infantum*. Agradecem também o apoio de Teresa Braga, Tsz Yan Chung e Lídia Rocha do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) pela valiosa ajuda na preparação dos extratos usados neste trabalho.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação à publicação deste artigo.

Referências

1. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017;57:1–29. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012
2. OMS. *Integrating neglected tropical diseases into global health and development*. Vol 4.; 2017. doi:WHO/HTM/NTD/2017.01
3. OMS. *Control of the leishmaniasis*.; 2010. doi:10.1038/nrmicro1766
4. OMS. Leishmaniasis. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Publicado 2019. Acedido Maio 30, 2019.
5. OMS. *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases*.; 2015. doi:10.1007/s00247-015-3337-5
6. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):1–40.

doi:10.1371/journal.pntd.0004349

7. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014;6(1):147–154. doi:10.2147/CLEP.S44267
8. Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011;4(1):197. doi:10.1186/1756-3305-4-197
9. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, et al. Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. Jaffe C, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(7):e261. doi:10.1371/journal.pntd.0000261
10. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014;69:S10–S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
11. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance.* 2010;15(10):1–11.
12. OMS. *Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region.* (Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M, eds.); 2017.
13. Lindoso J, Moreira C, Cunha M, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS – Res Palliat Care.* 2018;Volume 10:193–201. doi:10.2147/HIV.S143929
14. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 2013;29(7):339–345. doi:10.1016/j.pt.2013.05.003
15. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
16. Millán J, Ferroglia E, Solano-Gallego L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res.* 2014;113(6):2005–2014. doi:10.1007/s00436-014-3929-2
17. Campino L, Maia C. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. 2010;23(5):859–864.
18. Miró G, Petersen C, Cardoso L, et al. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2017;33(9):718–730. doi:10.1016/j.pt.2017.05.005
19. Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov Today.* 2017;22(10):1516–1531. doi:10.1016/j.drudis.2017.06.004
20. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 2016;155:113–123. doi:10.1016/j.actatropica.2015.12.016
21. Oliva G, Roura X, Crotti A, et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010;236(11):1192–1198. doi:10.2460/javma.236.11.1192
22. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):24–45. doi:10.4269/ajtmh.16-84256
23. Lamotte S, Späth GF, Rachidi N, Prina E. The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):1–14. doi:10.1371/journal.pntd.0005480
24. Leprohon P, Fernandez-Prada C, Gazanion É, Monte-Neto R, Ouellette M. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2015;5(1):26–35.

doi:10.1016/j.ijpddr.2014.09.005

25. Hamdi A, Bero J, Beaufay C, *et al.* *In vitro* antileishmanial and cytotoxicity activities of essential oils from *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves, stems and aerial parts. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):1–10. doi:10.1186/s12906-018-2128-6
26. Patel SM, Venkata KCN, Bhattacharyya P, Sethi G, Bishayee A. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. Em: *Seminars in Cancer Biology*. Vol 40. Elsevier; 2016:100–115. doi:10.1016/j.semcancer.2016.03.002
27. Tiwari R, Verma AK, Chakraborty S, Dhama K, Singh SV. Neem (*Azadirachta indica*) and its Potential for Safeguarding Health of Animals and Humans: A Review. *J Biol Sci.* 2014;14(2):110–123. doi:10.3923/jbs.2014.110.123
28. Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, *et al.* Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Front Plant Sci.* 2017;8:1–13. doi:10.3389/fpls.2017.00610
29. Ogbuewu I, Odoemenam, VU Obikaonu H, Opara M, *et al.* The growing importance of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in agriculture, industry, medicine and environment: A review. *Res J Med Plant.* 2011;5(3):230–245.
30. Tahir A El, Ibrahim AM, Satti GMH, Theander TG, Kharazmi A, Khalid SA. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phyther Res.* 1998;12(8):576–579. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199812)12:8<576::AID-PTR354>3.0.CO;2-#
31. Khalid FA, Abdalla NM, Mohamed HEO, Toum AM, Magzoub MMA, Ali MS. *In vitro* assessment of anti-cutaneous leishmaniasis activity of some Sudanese plants. *Turkiye Parazitoloji Derg.* 2005;29(1):3–6.
32. Jumba BN, Anjili CO, Makwali J, *et al.* Evaluation of leishmanicidal activity and cytotoxicity of *Ricinus communis* and *Azadirachta indica* extracts from western Kenya: *in vitro* and *in vivo* assays. *BMC Res Notes.* 2015;8(1):1–11. doi:10.1186/s13104-015-1605-y
33. Mans DRA, Beerens T, Magali I, *et al.* *In vitro* evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. *J Ethnopharmacol.* 2016;180:70–77. doi:10.1016/j.jep.2016.01.012
34. Singh SK, Bimal S, Narayan S, *et al.* *Leishmania donovani*: Assessment of leishmanicidal effects of herbal extracts obtained from plants in the visceral leishmaniasis endemic area of Bihar, India. *Exp Parasitol.* 2011;127(2):552–558. doi:10.1016/j.exppara.2010.10.014
35. Chouhan G, Islamuddin M, Want MY, *et al.* Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory potential and therapeutic cure *in vivo*. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):1–24. doi:10.1186/s13071-015-0788-3
36. Dayakar A, Chandrasekaran S, Veronica J, Sundar S, Maurya R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-leishmanial and immunomodulatory activity of Neem leaf extract in *Leishmania donovani* infection. *Exp Parasitol.* 2015;153:45–54. doi:10.1016/j.exppara.2015.02.011
37. Carneiro SMP, Carvalho FAA, Santana LCLR, Sousa APL, Neto JMM, Chaves MH. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A. Juss.). *Biol Res.* 2012;45(2):111–116. doi:10.4067/S0716-97602012000200002
38. Castoldi R, Correa VG, de Moraes GR, *et al.* Liquid nitrogen pretreatment of eucalyptus sawdust and rice hull for enhanced enzymatic saccharification. *Bioresour Technol.* 2017;224:648–655. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.099

39. OIE. Leishmaniosis. Em: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. ; 2018:491–502.
40. Castro GA. Antiparasitic potential of natural marine compounds. 2016.
41. Et-Touys A, Fellah H, Sebti F, *et al.* *In vitro* Antileishmanial Activity of Extracts from Endemic Moroccan Medicinal Plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (*S. clandestina* Batt. non L.). *European J Med Plants*. 2016;16(1):1–8. doi:10.9734/EJMP/2016/27891
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
43. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, *et al.* Cell Viability Assays. Em: *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center of Advancing Translational Sciences; 2016.
44. Mehdinezhad N, Ghannadi A, Yegdaneh A. Phytochemical and biological evaluation of some *Sargassum* species from Persian Gulf. *Res Pharm Sci* 2016;11(3):243–249.
45. Yuminoki K, Takeda M, Kitamura K, *et al.* Nano-pulverization of poorly water soluble compounds with low melting points by a rotation/revolution pulverizer. *Pharmazie*. 2012;67(8):681–686. doi:10.1691/ph.2012.1834
46. Tahir A El, Satti GMH, Khalid SA. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* (Lam.) Exell. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):227–233. doi:10.1016/S0378-8741(98)00129-9
47. da Silva ER, Maquiaveli C do C, Magalhães PP. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol*. 2012;130(3):183–188. doi:10.1016/j.exppara.2012.01.015
48. Venkatesan SK, Saudagar P, Shukla AK, Dubey VK. Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 2011;3(3):217–231. doi:10.1007/s12539-011-0101-x
49. Almeida-souza F, Taniwaki NN, Cláudia A, *et al.* Ultrastructural Changes and Death of *Leishmania infantum* Promastigotes Induced by *Morinda citrifolia* Linn . Fruit (Noni) Juice Treatment. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2016:1–9. doi:10.1155/2016/5063540
50. Alzohairy MA. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2016:1–11. doi:10.1155/2016/7382506

SÍNTESE

Os resultados promissores da literatura sobre a atividade anti*Leishmania* dos extratos de *Azadirachta indica* em algumas espécies de *Leishmania* incentivaram este estudo, principalmente os revelados contra *Leishmania donovani*, o agente etiológico da LV antroponótica. Sendo a *Leishmania infantum* o protozoário causador de LV na região mediterrânica e sendo o cão o principal reservatório e hospedeiro do parasita, era relevante estudar o potencial anti*Leishmania* da planta nesta espécie, uma vez que a LCan é uma realidade endémica com impacto na saúde pública e veterinária. O objetivo foi comum, alargar o leque de possibilidades contra a doença, dado que as opções farmacológicas têm vindo a revelar limitações.

Este estudo representa o primeiro relato sobre o potencial anti*Leishmania* do Neem em promastigotas de *L. infantum*, cujos resultados, em conjunto com os estudos anteriores, o homenageiam como uma poderosa alternativa farmacológica na obtenção de futuras moléculas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose.

Na realização deste trabalho experimental surgiram algumas dificuldades e limitações associadas. A contaminação das culturas de promastigotas foi uma das principais complicações na realização deste estudo. Inicialmente iam ser utilizados extratos aquosos e etanólicos, mas a concentração da mistura etanólica em evaporador rotativo não foi possível porque, obteve-se uma mistura azeotrópica, optando-se pela preparação de extratos metanólicos em sua substituição. Este trabalho limitou-se apenas à exposição dos promastigotas de *L. infantum* a extratos obtidos a partir das folhas, portanto, outras partes da planta poderão ser exploradas, tal como outros solventes para a obtenção de extratos. O mecanismo responsável pela redução da viabilidade celular dos promastigotas, tais como: indução de morte celular, alteração da morfologia ou do metabolismo, não foi estudado, pelo que seria curioso entender o processo de atuação dos extratos nas formas promastigotas para eventual comparação com o resultado nas formas amastigotas.

Como perspetivas futuras, para além de se pretender aperfeiçoar o que já foi mencionado anteriormente, ambiciona-se a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* com amastigotas, bem como a avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Azadirachta indica* nas células animais e humanas. Neste estudo, o método colorimétrico MTT foi eleito como metodologia única na avaliação da viabilidade celular dos promastigotas, no entanto, poderia ser interessante comparar os resultados com procedimentos mais recentes e sensíveis, como por exemplo o método fluorimétrico com base na resazurina. Trabalhar diferentes partes da planta com as mesmas técnicas de pulverização e maior número de ensaios independentes, ajudaria a entender se de facto poderão existir diferenças na composição química dos extratos e, conseqüentemente, na atividade anti*Leishmania*.