



Departamento de Química e Farmácia

“Leishmaniose: Tratamento atual e perspectivas de novos fármacos”

Luís Ricardo da Mota Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada por: Prof.^a Dr.^a M^a de Lurdes dos Santos Cristiano

2014



“Leishmaniose: Tratamento atual e perspectivas de novos fármacos”

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da lista de referências incluída.

Copyright© Luís Ricardo da Mota Fernandes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano pela sua orientação nesta monografia.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, por todo o apoio fornecido ao longo destes anos de curso.

Agradeço aos meus colegas que me acompanharam ao lado nestes anos, pela amizade, apoio, conselhos e espírito académico.

Agradeço a todo o pessoal dos Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia do Porto onde estagiei e fui bem acolhido por todos.

E, por fim, um importante agradecimento ao Governo de Portugal, pela Bolsa de Estudo oferecida que, ao longo destes anos, me permitiu realizar e concluir o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.



Abreviaturas

A

ADHB – ácido dihidrobetulínico

AdoMet – S-adenosilmetionina

AdoMetDC – S-adenosilmetionina descarboxilase

AnB – Anfotericina B

APA – 3-aminoxi-1-aminopropano

ATP – Trifosfato de adenosina

C

CDKs – Cinases dependentes de ciclina

CE₅₀ – 50% da concentração máxima eficaz

CI₅₀ – 50% da concentração máxima inibitória

Cys – Cisteína

Cys-Gly – Cisteína-Glicina

D

dcAdoMet – S-adenosilmetionina descarboxilada

DFMO – DL- α -difluorometilornitina

DHFR – Dihidrofolato redutase

E

EQS – Esqualeno sintase

F

FDA – *Food and Drug Administration*

G

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato



GR – Glutathiona redutase

I

IFN- α – Interferão- α

L

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LmPDI – *Leishmania major* proteína dissulfeto isomerase

LV – Leishmaniose Visceral

N

NNN – Neal, Novy, Nicolle

O

ODC – Ornitina descarboxilase

OMS – Organização Mundial de Saúde

P

PCR – Reação em cadeia catalisada pela polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PDI – Proteína dissulfeto isomerase

PKDL – “*post kala-azar dermal leishmaniasis*”

PTR1 – Pteridina redutase 1

S

Sb^V – Derivados antimoniais pentavalentes

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SMT – Esterol metiltransferase

T

TDR1 – Enzima tiol dependente redutase 1



TdS – Timidilato sintase

TNF – Fator de necrose tumoral

TPCK – N-tosil-L-lisil-clorometilcetona

TR – Tripanotiona redutase

TS – Tripanotiona sintetase

T(SH)₂ – Tripanotiona

V

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Índice

1. Resumo	XII
2. Abstract	XIII
3. Introdução	1
3.1. Leishmaniose	1
3.2. Agente causal.....	1
3.3. Morfologia e ciclo biológico	2
3.4. Fisiopatologia da leishmaniose.....	3
3.4.1. Leishmaniose cutânea.....	3
3.4.2. Leishmaniose visceral.....	4
3.4.3. Leishmaniose mucocutânea	4
3.5. Epidemiologia e Fatores de Risco	5
3.6. Diagnóstico	6
4. Tratamento	8
4.1. Terapias atuais	8
4.1.1. Derivados antimoniais pentavalentes	8
4.1.2. Pentamidina	13
4.1.3. Anfotericina B	14
4.1.4. Miltefosina.....	16
4.1.5. Paromomicina.....	17
4.1.6. Sitamaquina	19
5. Fármacos aprovados para outras doenças que se encontram em estudo para o tratamento de Leishmaniose	20
5.1. Artemisinina e derivados	20
5.2. Azóis.....	22
5.3. Imiquimod.....	23



5.4. Alopurinol.....	24
5.5. Buparvaquona.....	25
5.6. Produtos naturais de origem vegetal que se encontram em estudo para o tratamento de Leishmaniose.....	27
6. Potenciais alvos terapêuticos para o desenho de novos compostos ativos no tratamento de Leishmaniose.....	28
6.1. Enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas.....	29
6.2. Proteases.....	31
6.3. Enzimas envolvidas no metabolismo glicosomal.....	33
6.4. Enzimas envolvidas na via da tripanotiona.....	34
6.5. Cinases dependentes de ciclina.....	36
6.6. Enzimas da biossíntese de esteróis.....	36
6.7. Enzimas envolvidas na biossíntese de folatos.....	39
6.8. Topoisomerases.....	39
7. Conclusão.....	42
8. Bibliografia.....	44

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp. (adaptação a partir de informação disponibilizada pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas - INADI) ³	2
Figura 2. Representação da distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Mundo. ¹	6
Figura 3. Representação da estrutura do estibogluconato de sódio (Pentostam®).	9
Figura 4. Representação esquemática dos dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação dos derivados antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose. De acordo com o “modelo profármaco”, o Sb ^V é reduzido a Sb ^{III} , a forma que exerce a sua atividade leishmanicida. De acordo com o “modelo Sb ^V ativo”, este apresenta uma atividade leishmanicida intrínseca.	11
Figura 5. Representação da estrutura molecular da pentamidina.	14
Figura 6. Representação da estrutura molecular da anfotericina B.	15
Figura 7. Representação da estrutura molecular da miltefosina.	16
Figura 8. Representação da estrutura molecular da paromomicina.	18
Figura 9. Representação da estrutura molecular da sitamaquina.	19
Figura 10. Representação da estrutura molecular da A) artemisinina, B) artemeter e C) desoxiartemisinina.	21
Figura 11. Representação da estrutura molecular da BB 201.	22
Figura 12. Representação das estruturas moleculares de azóis antifúngicos considerados para o tratamento de Leishmaniose; A) cetoconazol, B) itraconazol, C) fluconazol e D) posaconazol.	23
Figura 13. Representação da estrutura molecular do imiquimod.	24
Figura 14. Representação da estrutura molecular do alopurinol.	25
Figura 15. Representação da estrutura molecular da A) buparvaquona, B) 3-fosfono-oximetil-buparvaquona e C) buparvaquona-3-fosfato.	26
Figura 16. Representação da estrutura molecular da maesabalida III, isolada do extrato de folhas de <i>Maesa balansae</i>	28
Figura 17. Representação da estrutura molecular da 5'-{[(Z)-4-amino-2-butenil]metilamino}-5'-desoxiadenosina (AbeAdo).	30
Figura 18. Representação da estrutura molecular da DL- α -difluorometilornitina (DFMO).	30

Figura 19. Representação da estrutura molecular da 3-aminoxi-1-aminopropano (APA).	31
Figura 20. Representação da estrutura molecular da fenil-(N-metil-piperazina-Phe-homoPhe- vinil)-sulfona (K11777).	32
Figura 21. Representação da estrutura molecular da N-tosil-L-lisil-clorometilcetona (TPCK).	32
Figura 22. Representação da estrutura molecular da N ⁶ -(1-naftalenometil)-2'-(3-metoxi-benzamido)adenosina.	33
Figura 23. Via da tripanotona. A figura mostra um esquema da síntese de tripanotona, partindo de glutationa e espermidina, em tripanossomatídeos. γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetase; ODC: Ornitina descarboxilase.	34
Figura 24. Representação da estrutura molecular da bacitracina.	35
Figura 25. Representação esquemática da via de biossíntese de esteróis em Leishmania. A via mostra os passos importantes, e as enzimas envolvidas, na biossíntese de esterol. O produto final em tripanosomatídeos é o ergosterol, contrariamente às células de mamíferos que é o colesterol.	37
Figura 26. Representação da estrutura molecular de A) E5700 e B) ER-119884.....	38
Figura 27. Representação da estrutura molecular da terbinafina.	38
Figura 28. Representação da estrutura básica molecular dos azasteróis.	39
Figura 29. Representação da estrutura molecular da A) camptotecina e do B) gimatecano.	40
Figura 30. Representação da estrutura molecular da 9-anilinoacridina.	41
Figura 31. Representação da estrutura molecular do ácido dihidrobetulínico (ADHB).	41



Índice de Quadros

Quadro 1. Testes de diagnóstico de leishmaniose..... 7

1. Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada, localizada sobretudo em regiões tropicais e subtropicais mas com incidência crescente no sul da Europa. É causada pela infeção dos parasitas do género *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotomíneos.

Existem várias formas de leishmaniose em seres humanos. As mais comuns são a leishmaniose cutânea, que provoca úlceras crónicas na pele desenvolvidas no local da picada do inseto vetor; a leishmaniose visceral, conhecida como Calazar, que é a forma mais grave, atingindo vários órgãos internos como o baço, fígado e a medula óssea, e podendo originar a morte do paciente; e a leishmaniose mucocutânea, caracterizada por úlceras crónicas similares às observadas na forma cutânea, que tendem a reaparecer após cicatrização das mucosas do nariz e da boca, geralmente associadas a infeções secundárias, levando a destruição de grandes extensões de tecido. A Leishmaniose ameaça cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 12 milhões de pessoas estão atualmente infetados e prevê o aparecimento de 2 milhões de novos casos por ano.

O tratamento atual é baseado em quimioterapia, que conta com um grupo pequeno de fármacos com limitações graves, como alto custo e toxicidade, difícil via de administração e fraca eficácia em áreas endémicas, devido a crescente seleção de resistência. Os antimónios pentavalente são o pilar da terapia há mais de 70 anos, com fármacos de segunda linha, anfotericina B e pentamidina, utilizados em caso de falha antimonial. Desde da introdução da miltefosina, no início deste século, não foram aprovados novos compostos leishmanicidas para o tratamento humano. Deste modo, o desenvolvimento de novos fármacos para a doença é crucial e urgente.

Esta dissertação apresenta uma breve abordagem da patologia, das estratégias quimioterapêuticas atualmente disponíveis e das perspectivas de novas terapêuticas e fármacos em desenvolvimento.

Palavras-chaves: Leishmaniose, Anfotericina B, Antimónios Pentavalentes, Miltefosina, Pentamidina, novos alvos terapêuticos

2. Abstract

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease found mainly in tropical and subtropical regions but with increasing incidence in Southern Europe. It is caused by infection of the parasites of the species *Leishmania*, transmitted by the bite of sandflies.

There are various forms of leishmaniasis in humans. The most common are cutaneous leishmaniasis, which causes chronic skin ulcers developed at the location of the bite of the insect vector, visceral leishmaniasis, known as kala-azar, which is the most severe form, affecting multiple internal organs such as the spleen, liver and bone marrow and may lead the patient to death, and mucocutaneous leishmaniasis, characterized by lesions similar to those observed in chronic cutaneous form, which tend to recur after healing of mucous membranes of the nose and mouth, usually associated with secondary infections, leading to destruction of large tissues. Leishmaniasis threatens about 350 million people in 88 countries worldwide. The World Health Organization (WHO) estimates that 12 million people are currently infected and predicts the appearance of 2 million new cases per year.

Current treatment is based on chemotherapy and relies on a handful of drugs with serious limitations such as high cost and toxicity, difficult route of administration and poor efficacy in endemic areas, due to the growing selection of resistance. The pentavalent antimonials have been the mainstay of therapy for over 70 years, with second-line drugs, amphotericin B and pentamidine, used in case of antimony failure. Since the introduction of miltefosine at the beginning of this century, no new antileishmanial compounds for human treatment were approved. Thus, the development of new chemotherapeutic solutions for the disease is crucial and urgent.

This monograph presents a brief overview of the disease, currently available chemotherapeutic strategies and prospects for new therapies and drugs in development.

Keywords: Leishmaniasis, Amphotericin B, Pentavalent Antimonials, Miltefosine, Pentamidine, New targets drugs

3. Introdução

3.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada causada por protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania* que são transmitidas aos seres humanos pela picada de flebótomos infetados do sexo feminino. Esta doença manifesta-se principalmente em três formas, a cutânea, a mucocutânea e a visceral, que resultam da infeção de macrófagos, na derme, na mucosa naso-orofaríngea e em todo o sistema reticuloendotelial, respetivamente.¹

3.2. Agente causal

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário intracelular obrigatório da família Trypanosomatidae e género *Leishmania* transmitida através de um vetor, o flebótomo, um inseto pertencente à ordem Díptera, família Psychodidae e género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo. A infeção humana é causada por cerca de 21 das 30 espécies que infetam mamíferos. Estes incluem o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani*, *L. infantum*, também conhecido como *L. chagasi* no Novo Mundo); o complexo *L. mexicana* com 3 principais espécies (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*; e do subgénero *Viannia* com quatro espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*). As diferentes espécies são morfológicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou monoclonais.²

3.3. Morfologia e ciclo biológico

O ciclo de vida de *Leishmania sp* (Fig. 1) inicia-se pela picada do flebótomo fêmea infetado no hospedeiro vertebrado, sendo injetada a fase infecciosa, ou seja, a fase promastigota, através da sua probóscide, durante a alimentação. As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Estas formas diferenciam-se dentro das células para a fase tecidular do parasita, isto é, a fase amastigota, multiplicando-se por divisão simples e continuando a infetar outras células fagocíticas mononucleares. Os flebótomos fêmeas saudáveis, após a ingestão de células infetadas durante a alimentação no hospedeiro vertebrado infetado, adquirem as formas amastigotas que, no seu interior, migram para o intestino onde se diferenciam em formas promastigotas infetantes, multiplicando-se e migrando para a probóscide.^{1,3}

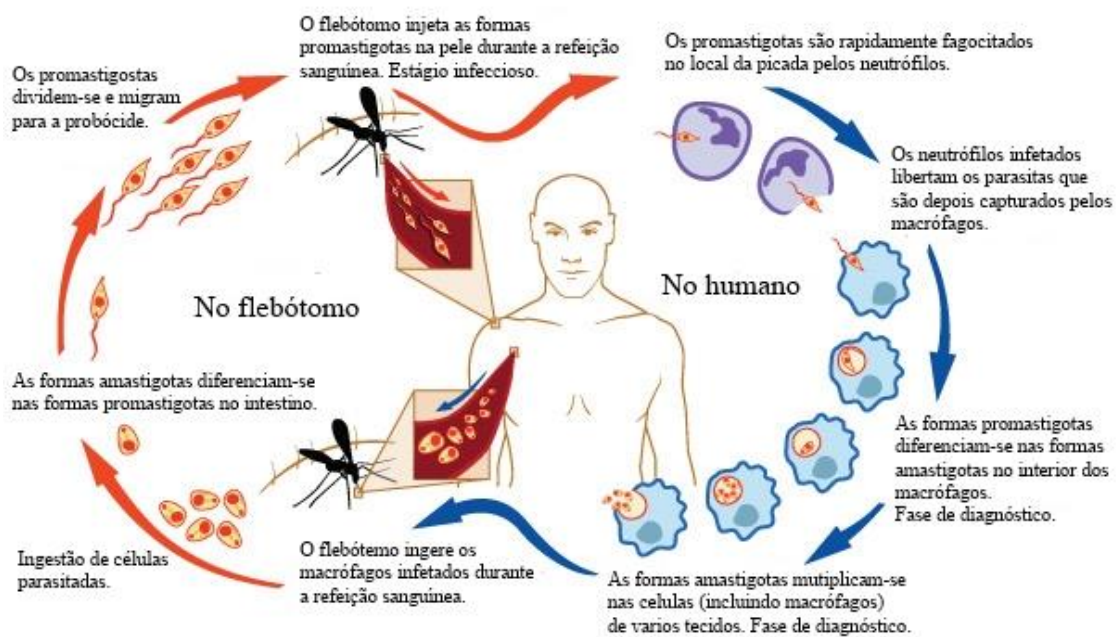


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania sp*. (adaptação a partir de informação disponibilizada pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas - INADI)³

3.4. Fisiopatologia da leishmaniose

Existem diferentes formas de leishmaniose em humanos e algumas pessoas podem desenvolver uma infecção silenciosa, sem sintomas ou sinais. A OMS tem usado as várias manifestações clínicas da leishmaniose para classificar esta doença em três formas clínicas distintas, de acordo com a sintomatologia e sistemas fisiológicos afetados; leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV).^{1,2}

Fatores como a pobreza, a desnutrição e, recentemente, a co-infecção com outras doenças, nomeadamente o vírus da imunodeficiência humana (VIH) podem aumentar o risco de infecção e agravar o prognóstico.¹

3.4.1. Leishmaniose cutânea

A LC é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, no Mundo Velho e no Novo Mundo. No Velho Mundo (hemisfério oriental), as principais espécies incluem *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, bem como *L. infantum* e *L. donovani*. As principais espécies do Novo Mundo (hemisfério ocidental) são as do complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) ou do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*). Em geral, a doença causa lesões na pele, que se desenvolvem várias semanas ou meses após a exposição, podendo aparecer anos mais tarde, devido a traumatismo ou imunossupressão. As lesões podem sofrer alteração, em tamanho e aparência, ao longo do tempo, começando geralmente como pápulas ou nódulos e terminando em úlceras. As lesões são geralmente indolores, mas podem ser dolorosas, especialmente se as lesões ulcerativas forem infetadas com bactérias ou se as lesões estiverem próximas de uma articulação. O processo de cura resulta normalmente em cicatriz atrófica.²

3.4.2. Leishmaniose visceral

A LV é a forma mais grave da doença, provocando a maior taxa de mortalidade caso não seja devidamente tratada. No início pode ser crónica, subaguda ou aguda. Embora o período de incubação varie geralmente de semanas a meses, a infeção assintomática pode levar anos ou décadas a manifestar-se clinicamente, surgindo como uma complicação associada a doenças que comprometem o sistema imunitário, como o VIH. A LV é geralmente causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* que afetam os órgãos internos, nomeadamente, o baço, o fígado, gânglios linfáticos e a medula óssea.²

As manifestações clínicas da infeção incluem: febre; perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, aumento dos níveis de proteína total e baixos níveis de albumina com hipergamaglobulinemia.²

O termo Kala-azar, que, em hindi, significa febre negra, é muitas vezes usado, em alternância com LV, para casos graves desta. Os casos graves de LV, não tratados, são normalmente fatais, seja pela ação direta da doença ou, indiretamente, por complicações dela derivadas, como infeções secundárias bacterianas ou hemorragia.²

Alguns pacientes desenvolvem *post kala-azar dermal leishmaniasis* (PKDL), um síndrome caracterizado por lesões na pele (como manchas eritematosas ou hiperpigmentadas, pápulas e nódulos), tipicamente observado na face, que se desenvolvem em intervalos variáveis após ou durante o tratamento para a LV. A PKDL é bastante descrita em casos de infeção por *L. donovani* no sul da Ásia e da África Oriental.²

3.4.3. Leishmaniose mucocutânea

A LMC é um exemplo de uma das formas mais comuns de leishmaniose. Esta forma pode ser a consequência de infeções de algumas das espécies do parasita que causam a LC, isto é, certos tipos de parasita podem disseminar-se a partir da pele e atingir as mucosas naso-orofaríngeas (nariz, boca ou garganta).²

A LMC é geralmente causada por espécies do subgénero *Viannia* (especialmente *L. (V.) braziliensis*, mas também *L. (V.) panamensis* ou *L. (V.) guyanensis*), podendo também ser causada por *L. amazonensis*. O tratamento sistémico da LC causada por estas espécies é pensado com o objetivo de reduzir o risco de aparecimento de lesões nas mucosas.²

Em geral, a doença torna-se clinicamente evidente ao fim de vários anos (por vezes décadas), através das lesões cutâneas de origem, que, inicialmente, não foram completamente tratadas. No entanto, lesões nas mucosas e na pele podem ser observadas concomitantemente, designando-se esta forma por leishmaniose tegumentar americana.²

As manifestações iniciais da LMC são em geral sintomas persistentes, como congestão ou sangramento nasais, embora os sintomas orais ou da faringe sejam por vezes notados em primeiro lugar. Se não tratada, a doença pode progredir para a destruição ulcerosa da mucosa naso-orofaríngea, com perfuração do septo nasal.²

3.5. Epidemiologia e Fatores de Risco

A leishmaniose é uma zoonose focada em áreas de mais de 90 países, nas regiões tropicais, subtropicais e sul da Europa (Fig. 2). É geralmente mais comum em zonas rurais do que nas áreas urbanas, sendo também encontrada na periferia de algumas cidades. O clima e outras mudanças ambientais têm potencial para expandir o alcance geográfico dos vetores e das áreas do mundo onde a leishmaniose é encontrada.²

A leishmaniose encontra-se em todos os continentes, exceto na Austrália e Antártida. No Velho Mundo (Hemisfério Oriental), a leishmaniose encontra-se em algumas partes da Ásia, Médio Oriente e África (em especial na região tropical e Norte de África), e no sul da Europa. Não é encontrada na Austrália ou nas ilhas do Pacífico. No Novo Mundo (Hemisfério Ocidental), é encontrada em algumas partes do México, América Central e América do Sul. Não é encontrada no Chile ou Uruguai. Foram detetados casos ocasionais de leishmaniose cutânea no Texas e em Oklahoma.² O número de novos casos de leishmaniose, por ano, é incerto. Para a leishmaniose cutânea, as estimativas do número de casos variam entre 700 mil e 1,2 milhões. Para a leishmaniose

visceral, as estimativas do número de casos variam aproximadamente de entre 200 mil e 400 mil.²

Em muitas das áreas geográficas onde a leishmaniose é encontrada, as pessoas infectadas não são necessárias para manter o ciclo de transmissão do parasita na natureza. Os animais infectados, como roedores e cães, juntamente com o flebótomo, mantêm o ciclo. No entanto, em algumas partes do mundo, as pessoas infectadas são necessários para manter o ciclo. Este tipo de transmissão (homem — flebótomo — humano) é classificada com antroponótica. Em áreas com transmissão antroponótica, o tratamento individualizado nos doentes pode ajudar a controlar a propagação do parasita.²

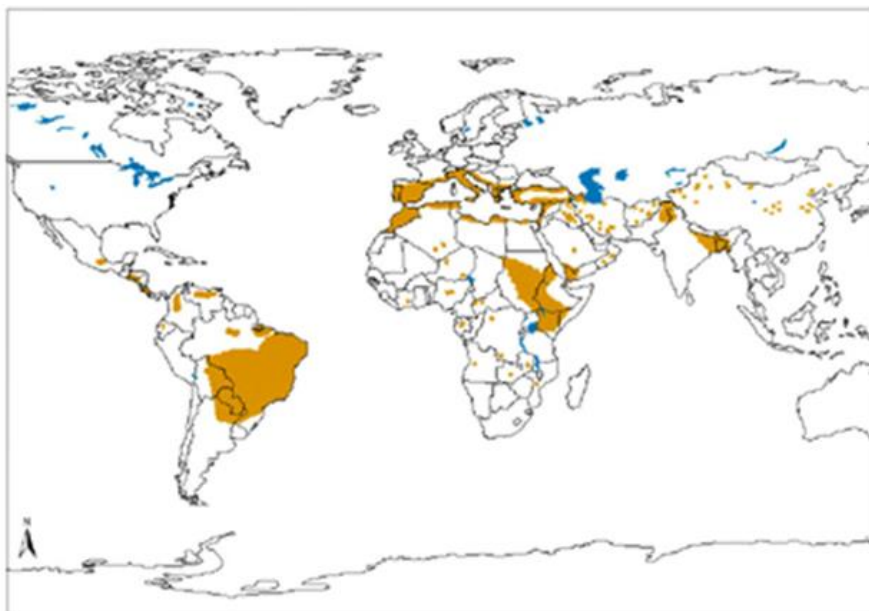


Figura 2. Representação da distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Mundo.¹

3.6. Diagnóstico

A leishmaniose é diagnosticada através da deteção de parasitas *Leishmania* em amostras de tecidos, a partir de lesões na pele, para a LC, ou na medula óssea, para a LV, através de exame por microscopia de luz, técnicas de cultura especializada ou métodos moleculares. Para a LV, o teste sorológico pode fornecer evidência de suporte para o diagnóstico.²

A identificação das espécies de *Leishmania* é importante, especialmente se mais de uma espécie for encontrada num paciente e se estes tiverem diferentes implicações clínicas e no prognóstico.² Os testes de diagnóstico atualmente disponíveis estão listados na Quadro 1.⁴

Quadro 1. Testes de diagnóstico de leishmaniose.

Histologia Raspagem, biópsia ou aspiração	É o método geralmente mais usado, pois é fácil de executar; permite a deteção de amastigotas no esfregaço e biópsia, ou de promastigotas no aspirado
Cultura Meio de drosófila de Schneider ou meio NNN (Neal, Novy, Nicolle)	Não é confiável, pois os organismos são difíceis de isolar, especialmente se as lesões forem antigas; os resultados podem demorar 1 a 3 semanas dependendo da carga parasitária
Técnicas moleculares PCR	Permite a identificação das espécies; é útil no acompanhamento de pacientes após o tratamento; não está disponível em regiões endémicas
Deteção de antígeno (utilizando anticorpos monoclonais) Hibridação de ADN (para deteção do genoma)	Não está disponível; associado a elevados custos Não é utilizado na prática; é ainda utilizado com ferramenta de investigação
Reação Intradérmica de Montenegro	Depende do tipo de resposta de hipersensibilidade retardada após a injeção de promastigotas mortos por via intradérmica; pode produzir resultados positivos em 3 meses após o aparecimento das lesões; o resultado é considerado positivo se ocorrer endurecimento superior a 5 milímetros após 48 h
Testes sorológicos ELISA, IFA, DAT, K39 ELISA, tiras de teste	A deteção de anticorpos no soro é útil no diagnóstico de leishmaniose visceral, mas não tem qualquer utilidade na doença cutânea

4. Tratamento

O tratamento atual para a leishmaniose é baseado em quimioterapia. O arsenal terapêutico está limitado a um grupo pequeno de fármacos que apresentam limitações graves, como custo elevado e toxicidade, difícil via de administração e fraca eficácia em áreas endêmicas, devido à crescente seleção de resistência. A leishmaniose é considerada uma das poucas doenças parasitárias suscetíveis de serem controladas através da vacinação, dada a capacidade mutante destes parasitas. Os antimónios pentavalente são o pilar da terapia há mais de 70 anos, usando-se anfotericina B e pentamidina como fármacos de segunda linha, em caso de falha antimonial. Desde a introdução da miltefosina, no início deste século, não foram aprovados novos compostos leishmanicidas para tratamento humano. Deste modo, o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença é crucial e urgente.

A abordagem terapêutica depende, em parte, de fatores relativos ao hospedeiro e ao parasita. Algumas abordagens só são eficazes contra certas espécies de *Leishmania* e apenas em determinadas regiões geográficas. Grupos especiais, tais como crianças, idosos, mulheres grávidas e pessoas que estão imunocomprometidos ou que têm outras co-morbidades, podem precisar de diferentes medicamentos ou regimes de dosagem.²

4.1. Terapias atuais

4.1.1. Derivados antimoniais pentavalentes

Os derivados antimoniais pentavalentes (Sb^V) como o estibogluconato de sódio (Fig. 3; Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) têm sido recomendados desde há mais de 70 anos para o tratamento de primeira linha da leishmaniose.⁵ Além de possuírem toxicidade considerável para o hospedeiro, a resistência do parasita a esta classe de fármacos está a aumentar, comprometendo a eficácia terapêutica da classe e o seu uso em algumas zonas do globo, por exemplo em Bihar, na Índia.⁶ Além disso, os ensaios *in vitro* para avaliar a suscetibilidade do parasita ao fármaco são longos e dispendiosos. Desta forma, para fins clínicos, é necessário desenvolver um método expedito e barato que permita distinguir, quantitativamente, as

respostas resistentes das sensíveis.⁷ A administração de complexos de antimónio é feita através de injetáveis, resultando muitas vezes em dor local durante as injeções intramusculares e em efeitos secundários sistémicos que obrigam a um controlo clínico cuidadoso.⁸ Estes efeitos secundários graves podem colocar a vida do doente em risco, pois surgem por vezes casos de pancreatite aguda, arritmia cardíaca, dores musculares geralmente reversíveis, insuficiência renal, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade.⁵ Assim, a administração desta classe de fármacos é contra-indicada durante a gravidez e também em doentes com problemas hepáticos, cardíacos ou com insuficiência renal.⁹

Estes compostos são quelatos não covalentes que, para exercerem efeito leishmanicida, têm de atravessar a membrana fagolisossomal e atuar contra a forma intracelular do parasita, isto é, a forma amastigota. Esta classe requer bioativação intracelular. Os complexos de Sb^V acumulam-se nas formas promastigotas e amastigotas, mas não têm atividade leishmanicida contra as formas promastigotas extracelulares, pois precisam de ser convertidos na forma trivalente, mais tóxica (Sb^{III}).^{10,11} Estudos sobre o modo de ação do Sb^{III} indicaram que inibe a tripanotona redutase¹² e a glutatona redutase,¹³ e induz a apoptose.¹⁴ Embora os complexos de antimónio tenham permanecido em uso clínico por várias décadas, o seu modo de ação permanece sob investigação e é objeto de intenso debate no seio da comunidade científica.

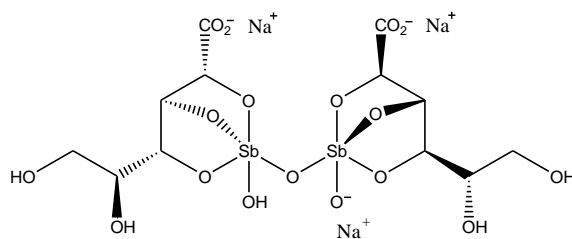


Figura 3. Representação da estrutura do estibogluconato de sódio (Pentostam®).

Devido à natureza hidrofílica que possuem, os compostos de antimónio não são absorvidos nem transportados através da barreira lipofílica intestinal. De facto, estes compostos são bastante solúveis em meio aquoso, mesmo em condições de pH baixo, que promovem a protonação do anião.¹⁵ Assim, dada a baixa disponibilidade oral destes fármacos, a sua administração ocorre por via intravenosa ou intramuscular. Estes medicamentos são caros, apresentam dificuldades ao nível das vias de administração, toxicidade considerável para o doente e conseqüente aumento da morbilidade, o que limita o seu uso clínico no tratamento da leishmaniose, sobretudo em países em vias de desenvolvimento.¹⁶

Avanços recentes mostram que o desenvolvimento de formulações baseadas em lipossomas e ciclodextrinas melhoram a biodisponibilidade destes fármacos. O uso de lipossomas tem sido até agora um dos meios mais eficientes para melhorar a eficácia antimonial contra a LV. Os lipossomas fornecem propriedades que melhoram o transporte adequado dos antimoniais. Têm a capacidade de encapsular e conservar eficazmente grandes quantidades de compostos solúveis em água, sendo o conjunto captado pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, as células que também capturam os parasitas *Leishmania*.^{17,18} As ciclodextrinas são oligossacáridos cíclicos compostos por unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4. São capazes de incluir no interior da sua cavidade hidrofóbica, com um elevado grau de seletividade, moléculas insolúveis em água, que aí ficam retidas através de interações não covalentes. Portanto, este transportador tem sido bastante utilizado para melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos insolúveis em água, devido ao aumento da solubilidade do fármaco e da taxa de dissolução.^{19,20}

Num estudo usando um antimoniato de meglumina- β -ciclodextrina, verificou-se um aumento na absorção de Sb por via oral num modelo murino de LC. A atividade anti-leishmaniose do complexo foi confirmada pela redução significativa da carga parasitária nas lesões dos animais tratados, quando comparados com os controlos de solução salina. Não foi observado nenhum sinal de toxicidade aguda nos ensaios *in vivo*. Este estudo estabeleceu, pela primeira vez, a possibilidade de uma formulação à base de ciclodextrina para o tratamento oral da leishmaniose com antimoniato de meglumina.¹⁵

O mecanismo de ação dos derivados antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose ainda não está esclarecido, suscitando intenso debate no seio da comunidade científica que investiga esta classe de compostos. Por exemplo, não é consensual se a forma ativa final destes antimoniais pentavalentes é Sb^V ou Sb^{III} . A figura 4 mostra os dois principais modelos propostos até agora para o mecanismo de ação dos derivados antimoniais pentavalentes.⁸

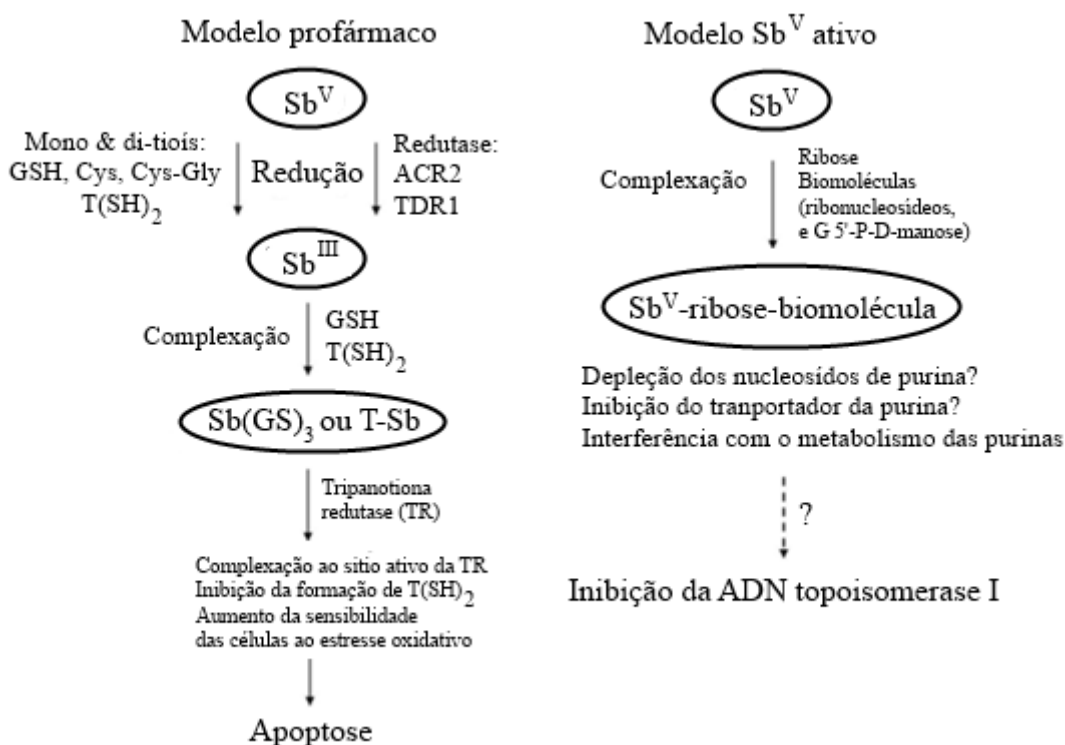


Figura 4. Representação esquemática dos dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação dos derivados antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose. De acordo com o “modelo profármaco”, o Sb^V é reduzido a Sb^{III} , a forma que exerce a sua atividade leishmanicida. De acordo com o “modelo Sb^V ativo”, este apresenta uma atividade leishmanicida intrínseca.

De acordo com o primeiro modelo (Modelo profármaco), o Sb^V comporta-se como um profármaco, que é reduzido no interior do organismo, originando uma espécie mais tóxica e ativa, o Sb^{III} . Este modelo é suportado pela observação *in vivo* em que parte da Sb^V é reduzido a Sb^{III} .²¹

Estudos indicam que os tióis podem atuar como agentes redutores desta conversão, entre os quais: a glutatona (GSH), que é o principal tiol no citosol das células de mamíferos; a cisteína (Cys) e a cisteína-glicina (Cys-Gly), que são os tióis predominantes dentro dos lisossomas, e o conjugado de glutatona-espermina, a tripanotona ($T(SH)_2$), que é o tiol predominante no interior do parasita.²²⁻²⁴ É referido também que a Cys, Cys-Gly e $T(SH)_2$, promovem a redução de Sb^V a Sb^{III} .²⁵

Estudos recentes indicam que a redução de Sb^V em Sb^{III} pode ocorrer pela interação com uma enzima tiol dependente redutase 1 (TDR1). Esta enzima catalisa a conversão do Sb^V em Sb^{III} , utilizando a glutatona como redutor. Verificou-se que a perda da atividade da redutase do parasita leva à resistência a estes fármacos, pois observou-se a perda de atividade da redutase em formas amastigotas de *Leishmania donovani* resistente à Sb^V .^{26,27}

Um estudo com base no tratamento em amastigotas de *Leishmania infantum* com Sb^{III} a baixas concentrações mostrou induzir a fragmentação do ADN, sugerindo a ocorrência de eventos tardios no processo global de apoptose²⁸

De acordo com o segundo modelo (Modelo Sb^V ativo), o Sb^V apresenta uma atividade anti-leishmaniose intrínseca. O estibogluconato de sódio mostrou inibir especificamente a ADN topoisomerase do tipo I de *Leishmania donovani*, através da inibição da clivagem e desenrolamento do plasmídeo superenrolado pBR322.²⁹ É descrito num estudo que a formação de um complexo entre o ribonucleósido adenina e a Sb^V ocorre mais rapidamente a pH ácido, indicando que esta complexação é cineticamente favorecida em compartimentos biológicos ácidos.³⁰ No que diz respeito ao possível papel farmacológico do complexo Sb^V -ribonucleósidos, duas hipóteses foram propostas: o complexo pode atuar como um inibidor dos transportadores de purina de *Leishmania*; estes complexos podem penetrar no interior do parasita, encontrando um ambiente de pH neutro e, em seguida, interferir com a via de recuperação das purinas.³¹

4.1.2. Pentamidina

A pentamidina (Fig. 5), formulada no sal isotionato de pentamidina, é uma diamidina usada principalmente para a prevenção e tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*. Este composto também demonstrou possuir atividade com interesse clínico contra alguns protozoários, tais como *Leishmania*, certas estirpes de *Trypanosoma* e *Babesia*, e certos fungos, tais como *Candida albicans*.⁴

Inicialmente, o isotionato de pentamidina foi usado na Índia, no tratamento de pacientes com LV que não respondiam à Sb^V. Porém, o decréscimo da sua eficácia e o alto risco de resistência levaram ao seu afastamento na Índia. Entretanto, foram testadas algumas estratégias terapêuticas de combinação envolvendo este fármaco. Um estudo em pacientes que não respondiam ao tratamento antimonial revelou que as combinações de uma dose baixa de pentamidina com alopurinol são mais eficazes e menos tóxicas que pentamidina, em dose terapêutica, e em regime de monoterapia, com percentagens de cura definitiva de 73% e 58%, respetivamente. Porém a eficácia daquelas combinações é questionável, quando comparada com a de outros fármacos.³²

Num estudo comparativo entre a pentamidina e antimoniato de meglumina, em pacientes com LC causada por *Leishmania braziliensis*, no Peru, mostrou que o antimoniato de meglumina exhibe maior eficácia do que a pentamidina.³³ No entanto, noutro estudo verificou-se que a pentamidina era mais eficaz na LC causada por *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*.^{34,35} Estudos mostram que a pentamidina é um fármaco seguro e eficaz contra a LC, com uma taxa de cura semelhante à exibida pelos antimonias pentavalentes. Atualmente, a pentamidina é usada especificamente como tratamento de primeira linha para infeções de *L. (V.) guyanensis*.^{34,36}

O seu mecanismo de ação não é ainda totalmente compreendido. É referido que a pentamidina entra nos promastigotas de *Leishmania donovani* através dos transportadores de arginina e poliamina, acumulando-se na mitocôndria e aumentando a eficácia dos inibidores do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial. Assim, a sua atividade leishmanicida é atribuída à diminuição do potencial de membrana mitocondrial. É referido também que a pentamidina inibe a topoisomerase II mitocondrial.^{37,38}

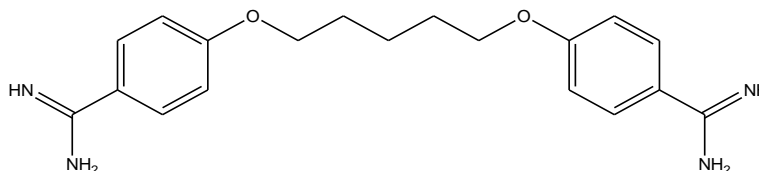


Figura 5. Representação da estrutura molecular da pentamidina.

A pentamidina parece ser uma solução quimioterápica mais aceitável que os derivados antimoniais pentavalentes, pois o tratamento decorre num espaço de tempo mais curto, implicando um menor tempo de internamento e, conseqüentemente, menores custos. No entanto, o fármaco demonstrou ter efeitos adversos graves, particularmente quando administrado em doses mais elevadas, levando a toxicidade renal, cardiotoxicidade, hipotensão e diabetes induzida. Porém, a pentamidina tem sido frequentemente utilizada como primeira escolha no tratamento da LC.³³

Quanto aos mecanismos de seleção de resistência a este fármaco, um estudo revelou que a resistência à pentamidina em clones promastigotas de *Leishmania donovani* e *Leishmania amazonensis* era acompanhada por uma diminuição da concentração intracelular do fármaco, tendo conseqüentemente sido atribuída ao desenvolvimento de mecanismos de efluxo do fármaco.³⁹

Devido ao crescente desenvolvimento de resistência, à toxicidade e a efeitos secundários adversos, o uso de pentamidina contra a LV é cada vez mais limitado.⁴⁰

4.1.3. Anfotericina B

A anfotericina B (AnB; Fig. 6) é um fármaco hidrófobo com um peso molecular elevado, que apresenta propriedades anfipáticas e anfotéricas. É um polieno antifúngico produzido pelo *Streptomyces nodosus*, que foi introduzido inicialmente como fármaco para o tratamento de infeções fúngicas sistémicas. A AnB mostrou também atividade antiparasitária e passou a ser também usada como terapia de segunda linha para o tratamento de LC, LV, e LMC, em casos em que se verifica insucesso antimomial.⁴¹ De um modo geral, a AnB não é indicado para a LC, com exceção de lesões da mucosa que não respondem à terapia antimomial.³⁶

A ação leishmanicida da AnB deve-se à sua capacidade de se ligar ao ergosterol, um dos principais esteróis da membrana em *Leishmania*. Num estudo recente, propõe-se que a ação da AnB pode ser devida a uma combinação de interações com esteróis, nomeadamente com o ergosterol da *Leishmania* e com o colesterol dos macrófagos do hospedeiro.⁴²

Como outros fármacos leishmanicidas, a AnB conduz a efeitos adversos indesejados, tais como nefrotoxicidade, hipocalcemia, anafilaxia e febre.⁵ A AnB é menos solúvel e instável a pH gástrico, o que impede a sua absorção no intestino delgado. Assim, a administração por via intravenosa é a preferida.⁴³

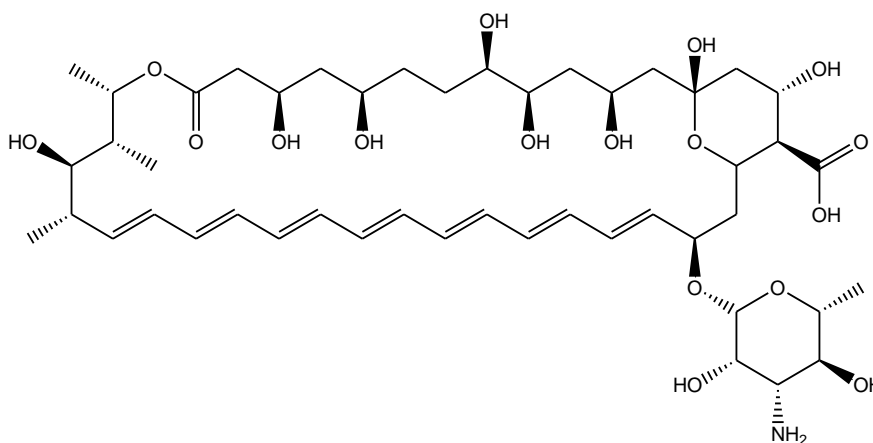


Figura 6. Representação da estrutura molecular da anfotericina B.

Para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade da AnB, foram desenvolvidas formulações lipídicas deste fármaco. As formulações lipídicas de AnB (AmBisome®, Amphocil® e Abelcet®), administradas por via intravenosa, mostraram ser um tratamento muito seguro e mais eficaz para a LV em áreas endémicas de *L. infantum* e de *L. Donovanii*, no Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal), onde recentemente foram recomendadas como tratamento de primeira linha pela comissão de especialistas da OMS dedicada ao controlo da leishmaniose.^{43,44}

Recentemente, foi realizado um estudo na Índia com base em 251 casos de LV tratados com uma dose total de 20 mg/kg (5 mg/kg nos dias 0, 1, 4 e 9), por via intravenosa, de acordo com a recomendação da OMS. A taxa de cura final observada foi

de 98,8%.⁴⁵ Devido à baixa toxicidade, a AnB lipossomal pode ser o fármaco escolhido para o tratamento dos pacientes co-infetados com VIH/LV.⁴⁶

Infelizmente, o custo elevado das novas formulações deste medicamento torna o tratamento inacessível para a maioria dos doentes com LV e a sua utilização contra a LC é restrita devido à escassez de estudos.⁴⁷ Assim, seria necessário que as principais partes interessadas no controle da leishmaniose, como a OMS e os doadores, investissem conjuntamente em planos para apoiar o acesso a formulações lipossomais de AnB genéricas, com garantia de qualidade e preços acessíveis para o tratamento da LV em zonas endémicas.⁴⁴

4.1.4. Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina; Fig. 7) é um análogo da fosfocolina que foi inicialmente desenvolvido como um agente antineoplásico para o tratamento tópico de metástases cutâneas do cancro da mama.⁴⁸ Verificou-se ter uma atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*, provavelmente através do efeito nas vias de sinalização celular e na síntese de membranas. A miltefosina administrada por via oral mostrou ter eficácia no tratamento da LV, na Índia, e também no tratamento da LC, no Paquistão.^{49,50}

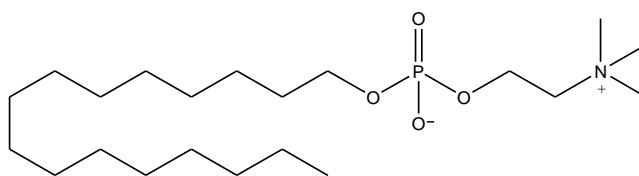


Figura 7. Representação da estrutura molecular da miltefosina.

Em março de 2014 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso da miltefosina no tratamento da LC causada por *Leishmania donovani*, em adultos e adolescentes que não estejam grávidas ou a amamentar. O uso da miltefosina para a LV causada por outras espécies, como por exemplo a *L. infantum*, representa ainda um uso *off-label*, assim como o tratamento em crianças menores de 12 anos.²

Verificou-se com grande preocupação que são facilmente gerados parasitas resistentes à miltefosina *in vitro*. Contudo, não há casos humanos notificados de leishmaniose resistente à miltefosina.⁵¹ A não adesão ao regime de tratamento recomendado pode potencialmente levar ao surgimento de resistência do parasita, da mesma forma que o aumento da utilização da miltefosina contra a leishmaniose canina na Europa pode levar à resistência em *L. infantum*. No entanto, prevê-se que a miltefosina venha a ser a principal forma de tratamento, na Índia e regiões circundantes.⁵²

O tratamento com miltefosina conduz a alguns efeitos secundários graves, tais como toxicidade gastrointestinal (náuseas, vômitos e diarreia) e um aumento significativo do nível de transaminases no soro. Estudos toxicológicos mostraram que os órgãos mais afetados são os olhos, os rins e o sistema reprodutivo. A miltefosina é teratogénica, sendo o seu uso proibido durante a gravidez.⁴⁸

O mecanismo de ação da miltefosina continua sob debate. Porém, os danos na membrana flagelar, a inibição da síntese de novo da fosfatidilcolina, a interferência no metabolismo de alquilfosfolípidos e na biossíntese da glicosilfosfatidilinositol, bem como a indução da apoptose, foram indicados como possíveis modos de ação.⁵³

4.1.5. Paromomicina

A paromomicina (Fig. 8) é um antibiótico aminoglicosídico de largo espectro, bastante hidrofílico, com um peso molecular elevado e com relativa insolubilidade em lípidos. As suas propriedades leishmanicidas foram identificadas na década de 60, com atividades variáveis entre as diferentes espécies de *Leishmania*.⁵⁴ Ensaios clínicos demonstram a sua eficácia no tratamento da LC e LV. Por via oral, a paromomicina é utilizada no tratamento da giardíase, amebíase e criptosporidíase. Tópicamente, é usada no tratamento da LC, no Velho Mundo (*L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*).⁵⁵ Estudos demonstraram que a paromomicina era capaz de inibir a síntese de proteínas *in vivo*, apenas na fase promastigota do parasita.⁵⁶ A paromomicina possui uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral. Porém, quando administrada por via intramuscular, é rapidamente absorvida, atingindo níveis plasmáticos máximos dentro de uma hora.⁵⁷

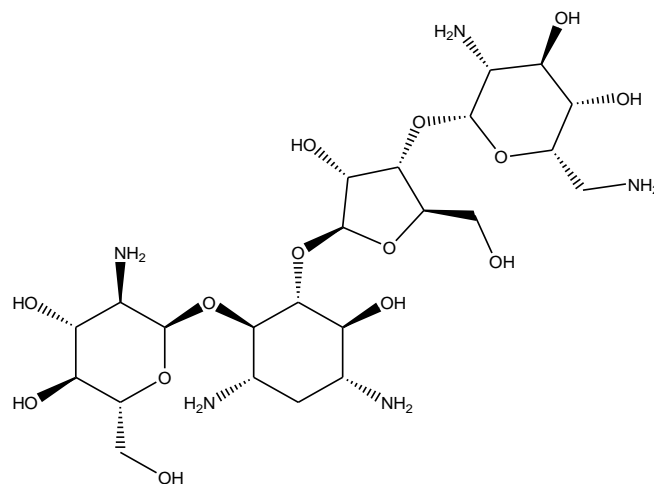


Figura 8. Representação da estrutura molecular da paromomicina.

A paromomicina injetável tem sido usada experimentalmente no tratamento da LV, principalmente a causada por *L donovani*.⁵⁵ Uma formulação tópica de sulfato de paromomicina contendo um cloreto de metilbenzalcónio ($[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{R}]\text{Cl}$; com R = metil) conduziu a uma taxa de cura de 77%. No entanto, a utilização de cloreto de metilbenzalcónio nestas formulações foi associada à inflamação e à sensação de queimadura, entre outros efeitos secundários localizados. Noutro estudo foi testada uma formulação contendo 15% de sulfato de paromomicina e 10% de ureia, que demonstrou reduzir o nível de irritação da pele mas com efeitos secundários semelhantes aos da formulação com cloreto de metilbenzalcónio, embora de menor intensidade.⁵⁸

Ensaio clínicos de Fase III da paromomicina injetável para a LV, realizados na Índia, mostraram boa eficácia, com baixa incidência de ototoxicidade reversível, aumento dos níveis de transaminases hepáticas e sem registo de nefrotoxicidade. No entanto, foram frequentemente registadas reações adversas tais como febre, inchaço, calafrios e vómitos. A paromomicina foi registada na Índia em 2006, para uso clínico, e está atualmente a ser avaliada em África, em regime de terapêutica combinada. As suas vantagens incluem também o amplo espectro de atividade contra outros agentes patogénicos e o seu baixo custo.⁵⁹

4.1.6. Sitamaquina

A sitamaquina (Fig. 9) é um fármaco que está a ser desenvolvido para tratamento oral da LV.⁶⁰ A vantagem deste novo fármaco é a sua via de administração oral. Porém, a sitamaquina não é ativa por via tópica para o tratamento de LC. Um estudo inicial de Fase II na Índia demonstrou uma taxa de cura de 50% contra a LV, com boa tolerância. Porém, apesar da eficácia demonstrada, estudos posteriores revelaram efeitos secundários que não tinham sido observados anteriormente, como vômitos, dispepsia, cianose, síndrome nefrótica e glomerulonefrite.⁶¹ Num estudo efetuado no Quênia verificou-se eficácia idêntica mas os efeitos secundários observados foram dor abdominal, dor de cabeça e disfunção renal. A sitamaquina afeta a motilidade, a morfologia e o crescimento do parasita.⁶²

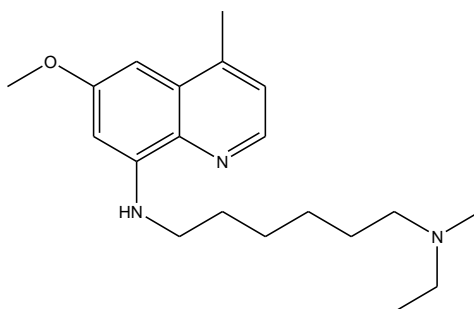


Figura 9. Representação da estrutura molecular da sitamaquina.

O seu mecanismo de ação envolve um gradiente elétrico que ocorre em dois passos: primeiro, a sitamaquina carregada positivamente interage com os grupos polares aniônicos dos fosfolípidos da membrana e, segundo, a inserção da sitamaquina nas membranas plasmáticas do parasita resulta numa interação hidrofóbica subsequente entre as cadeias de acilo de fosfolípidos e o anel hidrofóbico de quinolina, que conduz a uma inserção mais profunda do fármaco na monocamada lipídica, sendo este processo independente da energia e dos esteróis. No entanto, a afinidade da sitamaquina pelas membranas é transitória, uma vez que o principal local é no citosol. Uma vez dentro da célula a sitamaquina acumula-se rapidamente em compartimentos ácidos, principalmente nos acidocalcisomas, que são vacúolos ácidos que contém a maior parte

do cálcio celular. Porém, a ação leishmanicida da sitamaquina parece não estar relacionada com o seu nível de acumulação nos acidocalcisomas. Entretanto, análises proteômicas estão a ser feitas de modo a identificar os alvos da sitamaquina.⁶³

Recentemente, um estudo da sitamaquina em promastigotas *Leishmania donovani* demonstrou uma inibição dependente da dose do complexo II (sucinato desidrogenase) da cadeia respiratória em promastigotas permeabilizados com digitonina, em conjunto com uma diminuição nos níveis intracelulares de ATP. Demonstrou também uma diminuição do potencial eletroquímico mitocondrial, associado a um aumento de espécies reativas de oxigénio e de níveis intracelulares de Ca^{2+} , e ainda uma maior percentagem da população com conteúdo de ADN sub-G1 e exposição de fosfatidilserina, conduzindo a uma morte semelhante à apoptose em parasitas de *Leishmania*.⁶⁴

A sitamaquina apresenta uma curta semi-vida de eliminação em mamíferos, contribuindo para uma menor probabilidade do aparecimento de resistências. No entanto, com o objetivo de avaliar o risco de desenvolvimento de resistência à sitamaquina, foi induzida resistência numa linha de promastigotas de *L. donovani* a 160 μ M de sitamaquina, selecionada por pressão do fármaco *in vitro*, e estudadas algumas das características desta linha resistente. A CI_{50} (50% da concentração máxima inibitória) da sitamaquina na linhagem resistente foi cerca de cinco e três vezes mais elevada do que nas linhagens *wild-type* em promastigotas e amastigotas intracelulares, respetivamente. Contudo, não foram observadas resistências cruzadas com outros fármacos leishmanicidas, permitindo assim a sua utilização em combinação com outro fármaco leishmanicida, em caso de resistência à sitamaquina.⁶³

5. Fármacos aprovados para outras doenças que se encontram em estudo para o tratamento de Leishmaniose

5.1. Artemisinina e derivados

A artemisinina, e alguns dos seus derivados semi-sintéticos, dihidroartemisinina, artesunato, artemeter e arteeter, são atualmente utilizados no tratamento da malária em terapias combinadas recomendadas pela OMS. Foi reportado que a artemisinina e a

artemeter (Fig. 10) exibem atividade contra amastigotas em macrófagos de ratinhos infectados.⁶⁵ Posteriormente, num estudo desenvolvido por Loiseau e colaboradores, um conjunto de 70 derivados de artemisinina foram avaliados contra promastigotas de *L. donovani* e mostraram atividade. A importância do grupo peróxido foi evidente uma vez que os análogos da 1-desoxiartemisinina (Fig. 10) não mostraram qualquer atividade leishmanicida.⁶⁶

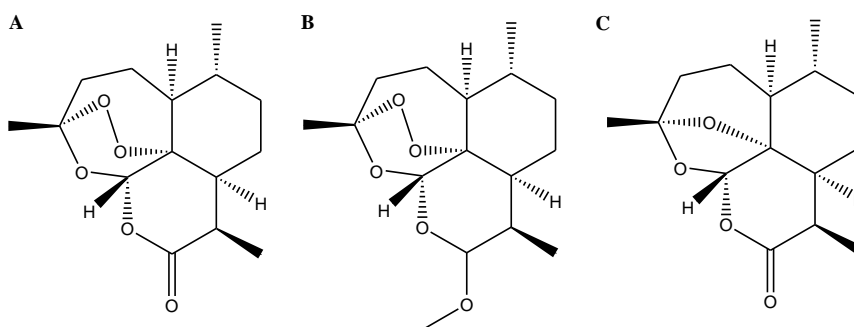


Figura 10. Representação da estrutura molecular da A) artemisinina, B) artemeter e C) 1-desoxiartemisinina.

Noutro estudo de continuidade foi avaliada a atividade leishmanicida *in vitro* de 19 compostos fluorados derivados da artemisinina contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani*. A fluoração é responsável pela maior lipofilicidade, aumento de estabilidade e atividade leishmanicida *in vitro*. Verificou-se que o composto mais ativo era o BB 201 (Fig. 11) um derivado de aminado que exibiu um CI_{50} de cerca de 1 μ M. Porém, apesar da ausência de toxicidade em macrófagos, não se verificou atividade nas formas amastigotas intracelulares a 10 μ M. Apesar das membranas que têm que ser atravessadas pelos compostos e as condições de pH entre o ambiente intra-eritrócito do *Plasmodium* e intra-macrófago da *Leishmania* serem semelhantes, os alvos atingidos pelos derivados de artemisinina em promastigotas podem ser diferencialmente expressos em amastigotas.⁶⁷

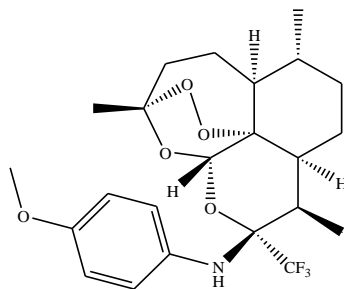


Figura 11. Representação da estrutura molecular da BB 201.

5.2. Azóis

Tal como a AnB, alguns azóis antifúngicos estão a ser avaliados relativamente à sua utilização no tratamento de LC no Velho Mundo. Os azóis antimicóticos cetoconazol, itraconazol e fluconazol (Fig. 12) mostraram atividade contra a *Leishmania* ao inibir a enzima 14 α -desmetilase, que converte o lanosterol em ergosterol, um componente importante na membrana do parasita. Existem vários estudos clínicos de azóis contra a LC, mas a eficácia demonstrada tem sido variada. Alguns autores referiram bons resultados com cetoconazol, mas a maioria sugere que o cetoconazol, tanto por via tópica como por via oral, não é muito eficaz em LC.⁶⁸

O itraconazol foi testado para tratamento da LMC mas verificou-se ser eficaz somente contra formas leves a moderadas da doença, limitando assim a sua utilização.⁶⁹ Foi relatado um caso de sucesso de uma criança com LC tratada com itraconazol.⁷⁰

O posaconazol, um derivado de triazol que contém uma triazolona na cadeia principal, está a ser desenvolvido como antifúngico mas também foi testado em modelos experimentais de LC e LV. Quando usado em doses elevadas, este fármaco mostrou possuir eficácia superior à da AnB na redução do tamanho das lesões cutâneas, mas foi menos eficaz no tratamento de LV, em ratos infetados com a doença.⁷¹

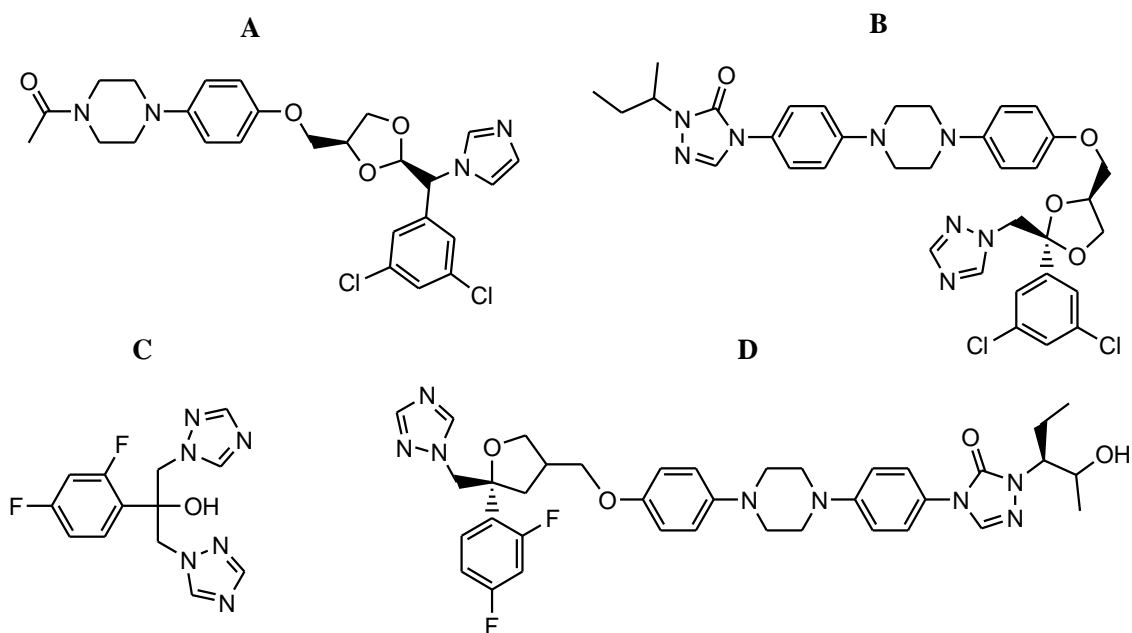


Figura 12. Representação das estruturas moleculares de azóis antifúngicos considerados para o tratamento de Leishmaniose; A) itraconazol, B) posaconazol, C) fluconazol e D) posaconazol.

5.3. Imiquimod

O imiquimod (Fig. 13) é um composto recentemente aprovado pela FDA para o tratamento de queratose actínica, carcinoma de células basais superficiais e verrugas genitais externas e perianais causadas pela infeção do vírus do papiloma humano. Encontra-se formulado num creme tópico chamado Aldara®, indicado para o tratamento de doenças dermatológicas, tanto de origem infecciosa como neoplásica.⁷²

O imiquimod é um modificador da resposta imunitária que aumenta a produção de citocinas tais como o interferão- α (IFN- α), uma diversidade de interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF), com subsequente ativação dos sistemas imunitários inato (rápido, não específico) e adaptativo (específico, celular e humoral).⁷³

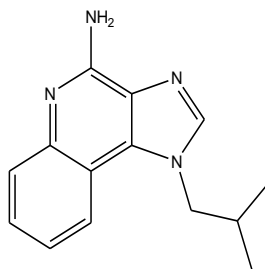


Figura 13. Representação da estrutura molecular do imiquimod.

Num estudo *in vitro*, o imiquimod mostrou ativar os macrófagos, com libertação de monóxido de azoto e conseqüente morte das formas amastigotas intracelulares da *Leishmania*. Também mostrou eficácia no tratamento da LC induzida experimentalmente em murino.⁷³

A terapia combinada do imiquimod e do antimoniato de meglumina revelou ser uma solução alternativa promissora para o tratamento da LC no Novo Mundo. Num ensaio clínico duplamente cego, efetuado em 40 pacientes com LC que não respondiam ao tratamento antimonial isoladamente, a combinação imiquimod/antimoniato de meglumina conduziu a uma taxa de cura de 72%. Porém, a maioria das evidências foram obtidas através de estudos com um número limitado de doentes, sendo necessários estudos adicionais mais alargados para confirmar os resultados atuais.⁷⁴

5.4. Alopurinol

O alopurinol (Fig. 14) é um inibidor da xantina oxidase utilizado no tratamento da gota que demonstrou ser eficaz no tratamento da LC na Ásia (74%). Em pacientes iranianos infetados com *L. major*, a adição de alopurinol reduziu para metade a dose antimonial necessária para atingir a mesma eficácia.⁹

O alopurinol demonstrou inibir o crescimento de *Leishmania in vitro*, em concentrações que são atingíveis em tecidos humanos e fluidos corporais. Pensa-se que composto atua impedindo a síntese de novo de pirimidinas, o que leva à inibição da síntese de proteínas do parasita *Leishmania*.⁷⁵

Um estudo revelou uma taxa de cura de 71% em pacientes que receberam tratamento combinado de alopurinol e estibogluconato, por via oral, em relação a pacientes que receberam só estibogluconato, onde a percentagem de cura foi de 39%.⁷⁶

Noutro estudo, utilizando uma combinação de alopurinol e antimoniato de meglumina, foi obtida uma taxa de cura de 74%, contra os 36% em pacientes tratados apenas com antimoniato de meglumina.⁷⁷ Estes estudos sugerem que o alopurinol pode ser útil no tratamento da LC no Novo Mundo, mas apenas em terapia combinada com os antimoniais pentavalentes.⁷⁸

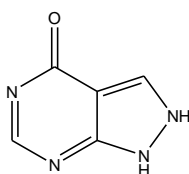


Figura 14. Representação da estrutura molecular do alopurinol.

5.5. Buparvaquona

A buparvaquona, uma hidroxinaftoquinona (Fig. 15), é atualmente comercializada para o tratamento da teileriose e mostrou atividade contra protozoários, incluindo *Leishmania donovani*. O seu baixo peso molecular e ponto de fusão favorecem propriedades físico-químicas adequadas para a utilização tópica. No entanto, a baixa solubilidade aquosa e a elevada lipofilicidade contribuíram para a baixa eficácia *in vivo*, em modelos de LV e LC.⁴⁸

O mecanismo de ação das hidroxinaftoquinonas é desconhecido. Em *Plasmodium* foi proposto que estes compostos inibem a transferência de eletrões no complexo III da cadeia respiratória mitocondrial. Outro modo de ação proposto para as hidroxinaftoquinonas envolve a capacidade do fármaco formar radicais livres durante a interação com a cadeia respiratória do parasita.⁷⁹

De modo a aumentar a solubilidade em meio aquoso e a absorção no tratamento tópico para a LC e LV, foram desenvolvidos dois pró-fármacos fosfatados, a buparvaquona-3-fosfato e a 3-fosfono-oximetil-buparvaquona (Fig. 15). Ambos os pró-fármacos mostraram aumentar consideravelmente a biodisponibilidade e eficácia da buparvaquona, reduzindo significativamente na carga parasitária em ratinhos. A buparvaquona-3-fosfato mostrou ser a melhor formulação oral. Contudo, a ligeira redução de 34% da carga de parasitas no fígado só foi observada em doses de 50 mg/kg/dia.⁸⁰

Em estudos anteriores, a buparvaquona demonstrou exibir eficácia leishmanicida *in vitro* e *in vivo*, em modelos de LV. Estudos mais recentes mostraram que a buparvaquona é ativa contra as formas promastigotas e amastigotas, em várias espécies de *Leishmania*, em concentrações nanomolares.⁸¹ Uma nova formulação lipossomal de buparvaquona, contendo fosfatidilserina, revelou resultados promissores, com atividade em doses inferiores à da buparvaquona livre.⁸²

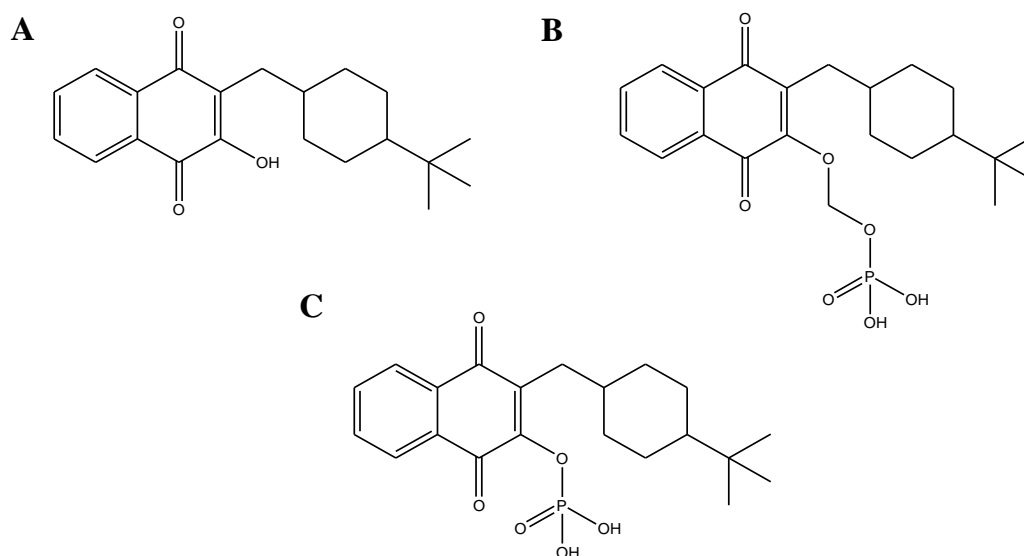


Figura 15. Representação da estrutura molecular da A) buparvaquona, B) 3-fosfono-oximetil-buparvaquona e C) buparvaquona-3-fosfato.

5.6. Produtos naturais de origem vegetal que se encontram em estudo para o tratamento de Leishmaniose

Uma grande diversidade de produtos naturais possui atividade antiparasítica. Contudo, a maioria destes produtos também apresenta propriedades indesejáveis, tais como elevada toxicidade, baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade, menor eficácia em doses moderadas e incapacidade para administração oral ou tópica. Porém, a variedade de extratos vegetais oferece uma elevada diversidade estrutural e, com ela, a possibilidade de novos compostos leishmanicidas. Os produtos isolados de plantas constituem um grande grupo de quimiotipos que incluem quinonas, alcalóides, terpenos, saponinas, derivados fenólicos e outros metabolitos. Infelizmente a maior parte dos compostos não satisfaz as condições necessárias para o desenvolvimento de fármacos, devido à sua inatividade *in vivo* ou elevada citotoxicidade, exigindo assim modificações na sua estrutura química básica. Um número crescente de novos compostos isolados de extratos de plantas tem sido testado *in vivo* em modelos animais da doença. Alguns destes estudos conduziram a resultados promissores.⁸³

O extrato de *Maesa balansae*, contendo saponinas triterpénicas, não exibiu potencial leishmanicida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Porém, um estudo *in vivo* de um único componente do extrato, maesabalida III (Fig. 16), demonstrou uma redução de 94,2% das formas amastigotas em fígado de hamster, numa única dose de 0,8 mg/kg.⁸⁴

Outros exemplos são os componentes do extrato de *Piper rusbyi*,⁸⁵ as frações de *Dysoxylum binectariferum*⁸⁶ e uma série de flavonóides e seus análogos⁸⁷ que exibiram potencial leishmanicida significativo e ausência de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

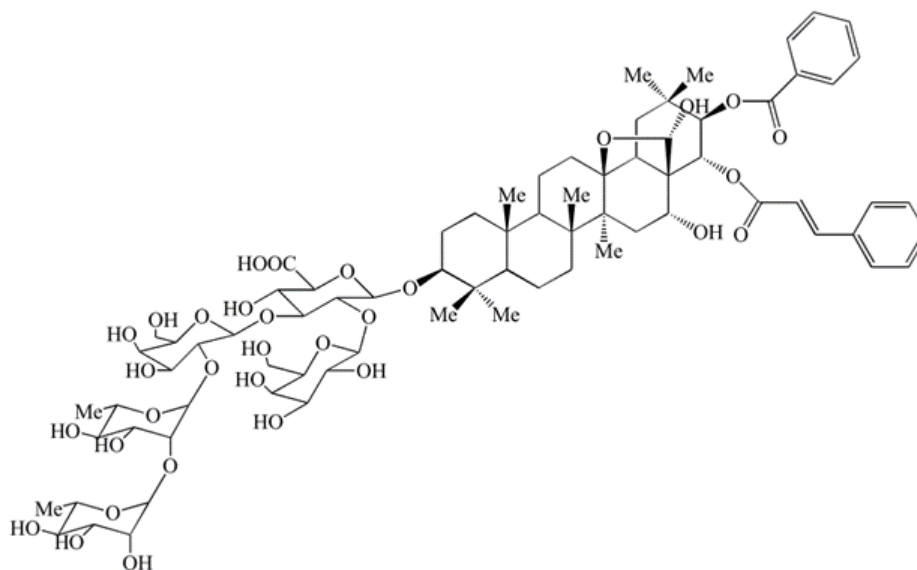


Figura 16. Representação da estrutura molecular da maesabalida III, isolada do extrato de folhas de *Maesa balansae*.

6. Potenciais alvos terapêuticos para o desenho de novos compostos ativos no tratamento de Leishmaniose

A conceção e desenvolvimento de um fármaco com atividade contra um dado parasita deve ter em conta as vias bioquímicas e metabólicas essenciais para a sobrevivência desse parasita. Para tal, as vias alvo devem ser específicas do parasita, ou ter diferenças estruturais e funcionais significativas relativamente às homólogas em mamíferos, para que a inibição das vias do parasita seja seletiva. Porém, em muitos casos estas condições são difíceis de encontrar, e para muitos dos medicamentos existentes o modo de ação e alvos terapêuticos moleculares envolvidos são desconhecidos. A maioria dos alvos terapêuticos considerados em estratégias de conceção de fármacos baseadas em estrutura e ligação com o alvo (“*structure-based*” e “*ligand-based*”) têm sido os recetores da superfície das células e enzimas, devido à relativa facilidade de inibir ou alterar a sua função pela interação com moléculas pequenas. No entanto, com o aumento do conhecimento acerca das vias bioquímicas do parasita, e aproveitando as suas diferenças estruturais e funcionais relativamente ao hospedeiro humano, é possível identificar racionalmente novos alvos terapêuticos. Caso o alvo seja uma enzima, será possível desenvolver inibidores específicos de modo a impedir a sua função e, conseqüentemente, levar à diminuição da viabilidade celular do parasita.

6.1. Enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas

Algumas poliaminas, como a putrescina, a espermidina e a espermina, desempenham um papel importante no crescimento e diferenciação do parasita da forma promastigota para a forma amastigota, e também regulam a peroxidação lipídica mediada por compostos oxidantes, mantendo assim o ambiente compatível com a sobrevivência.^{88,89} O parasita sobre-expressa enzimas envolvidas no metabolismo de poliaminas como a arginase, a ornitina descarboxilase (ODC), a s-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC) e a espermidina sintase. No entanto, as reservas de poliaminas permanecem inalteradas durante o seu crescimento e metabolismo, o que implica a existência de mecanismos de regulação.⁹⁰ Assim, o conhecimento destes mecanismos de regulação possibilita a identificação de novos alvos terapêuticos.

Em *Leishmania*, a arginina é convertida em L-ornitina pela enzima arginase. A L-ornitina é ainda convertida em putrescina, através da descarboxilação, pela enzima ornitina descarboxilase, que por sua vez é convertida em espermidina e espermina, sendo estas as substâncias responsáveis pelo crescimento celular e proliferação da *Leishmania*.⁹¹

A AdoMetDC catalisa a descarboxilação da s-adenosilmetionina (AdoMet) em AdoMet descarboxilada (dcAdoMet), que serve como dador do grupo aminopropilo na síntese da espermidina e espermina. A 5'-{[(Z)-4-amino-2-butenil]metilamino}-5'-desoxiadenosina (Fig. 17 ; AbeAdo), um análogo estrutural da dcAdoMet, é um inibidor irreversível, muito potente e específico, da AdoMetDC.⁹² A AbeAdo mostrou inibir o crescimento de culturas *wild type* de promastigotas de *L. Donovanii*, apresentando uma CE₅₀ (50% da concentração máxima eficaz) de 40 µM.⁹³ Desta forma, os inibidores da AdoMetDC mostraram curar animais infetadas com leishmaniose, mas ainda não foram testadas em seres humanos.⁹⁴

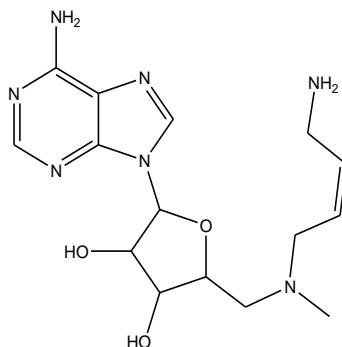


Figura 17. Representação da estrutura molecular da 5'-{[(Z)-4-amino-2-butenil]metilamino}-5'-desoxiadenosina (AbeAdo).

A ODC, que catalisa a descarboxilação da ornitina a putrescina, pode ser irreversivelmente inativada por substratos e produtos análogos, entre eles, a DL- α -difluorometilornitina (Fig. 18; DFMO) que é, de longe, o mais utilizado. É considerado um ‘inibidor suicida’, isto é, o seu mecanismo de ação baseia-se na ativação da enzima alvo, assegurando uma elevada especificidade, e formação de uma ligação irreversível ao centro ativo.⁹⁴ A DFMO e outros análogos fluorados da ornitina mostraram citotoxicidade e capacidade inibidora do crescimento, não só nas subespécies *T. brucei*, mas também em *L. donovani*⁹⁵ e *L. infantum*.⁹⁶ Como a ODC de *T. brucei*, a ODC de *Leishmania* apresenta uma semivida longa, sendo uma vantagem terapêutica que permite obter uma inibição de longa duração da enzima.⁹⁷

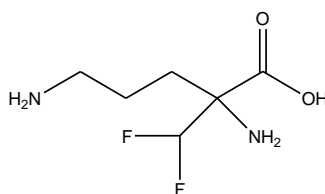


Figura 18. Representação da estrutura molecular da DL- α -difluorometilornitina (DFMO).

O 3-aminoxi-1-aminopropano (Fig. 19; APA) é um análogo isostérico da putrescina que estabelece interações fortes, mas reversíveis, com a ODC.⁹⁸ O grupo aminoxi pode formar uma oxima através do co-factor fosfato de piridoxal e o azoto do grupo amina,

carregado positivamente, pode estabilizar a APA no sítio ativo da enzima. A APA provou ser um inibidor potente no crescimento de promastigotas de *L. Donovanii*, apresentando uma CI_{50} de 42 μM . O tratamento com APA reduziu os níveis de putrescina, espermidina e tripanotona, e após a adição de putrescina ou de espermidina o efeito anti-proliferativo da APA cessou. A APA mostrou ser 10 vezes mais eficaz que a DFMO contra amastigotas num modelo de macrófagos, apresentando uma CI_{50} de 5 μM .⁹⁹

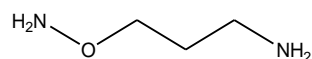


Figura 19. Representação da estrutura molecular da 3-aminoxipropano-1-amine (APA).

6.2. Proteases

As proteases são um grande grupo de enzimas ubíquas envolvidas em muitas funções fisiológicas e que recentemente suscitaram grande interesse como potenciais alvos terapêuticos em determinadas doenças, tais como doenças inflamatórias e infecciosas, para as quais alguns inibidores de proteases estão a ser investigados com o objetivo de desenvolver fármacos eficazes.^{100,101} As proteases são enzimas alvo com bastante interesse devido aos seus papéis na replicação, metabolismo e sobrevivência dos parasitas. Desta forma, os inibidores de protease específicos podem ser utilizados para regular a atividade da protease, dentro das células ou em organismos.¹⁰² Existe um total de 154 proteases presentes no genoma em *Leishmania* que inclui proteases cisteínicas, serínicas, aspartases e metaloproteases.¹⁰³ Vários estudos de proteases de *Leishmania*, principalmente metaloproteases gp63 e proteases cisteínicas, mostraram ser essenciais no estabelecimento e na proliferação da infeção por *Leishmania*.¹⁰⁴

As proteases de cisteínicas de *Leishmania* desempenham funções importantes em vários processos, tais como a modulação da resposta imune do hospedeiro, a degradação de várias proteínas do hospedeiro, autofagia parasitária, diferenciação de promastigotas para amastigotas e modificação das respostas do hospedeiro na invasão celular.¹⁰⁴ Estudos com estirpes de *Leishmania* deficientes em proteases cisteínicas e com parasitas expostos a um inibidor específico de proteases de cisteínicas (Fig.20; fenil-(N-metil-piperazina-

Phe-homoPhe-vinil)-sulfona) mostram uma redução significativa da virulência e infecciosidade.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

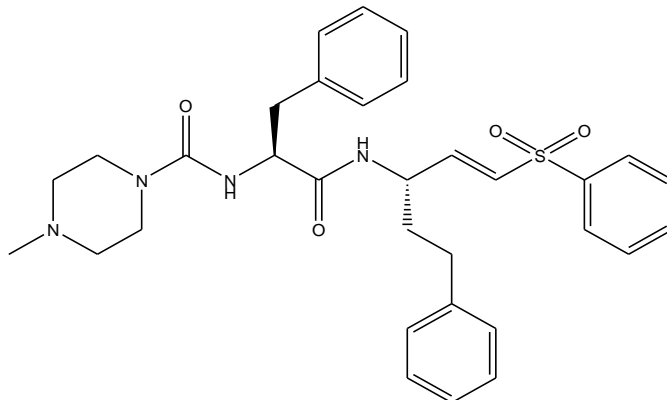


Figura 20. Representação da estrutura molecular da fenil-(N-metil-piperazina-Phe-homoPhe- vinil)-sulfona (K11777).

Além das proteases cisteínicas, também as proteases serínicas se encontram atualmente em estudo como potenciais alvos terapêuticos, em *Leishmania*. Num estudo, foram selecionados inibidores clássicos, N-tosil-L-lisil-clorometilcetona (Fig. 21; TPCK) e benzamidina, conhecidos como inibidores das proteases serínicas em *L. Amazonensis*, tendo-se observado a inibição do crescimento da *Leishmania* e alterações morfológicas substanciais no parasita.¹⁰⁸

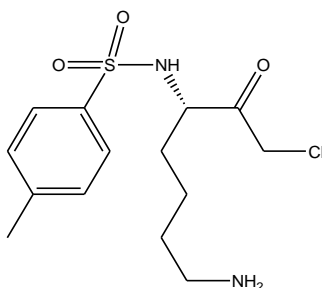


Figura 21. Representação da estrutura molecular da N-tosil-L-lisil-clorometilcetona (TPCK).

6.3. Enzimas envolvidas no metabolismo glicosomal

A *Leishmania* depende exclusivamente de seu hospedeiro, como fonte de carbono para suprir as suas necessidades energéticas. Os glicossomas são organelos que desempenha um papel importante em muitas das atividades metabólicas de *Leishmania*, como a glicólise, a oxidação de ácidos gordos e a biossíntese de lípidos, apresentando características filogenéticas únicas em relação ao hospedeiro mamífero. Estas características podem ser investigadas e exploradas na perspectiva da conceção de inibidores específicos, com base na estrutura das enzimas parasitárias.¹⁰⁹

Foram sintetizados análogos da adenosina como potenciais inibidores específicos da ligação estreita da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) que aloja a porção adenosílica do co-substrato NAD^+ , com base na sua estrutura cristalina. A adenosina mostrou ser um fraco inibidor da GAPDH, mas alguns análogos, com substituições na posição 2' da ribose e na posição N^6 na adenosina, resultam em aumento da inibição da enzima. Um dos análogos, N^6 -(1-naftalenometil)-2'-(3-metoxi-benzamido)adenosina (Fig. 22) mostrou inibir o crescimento de *L. mexicana* com uma CI_{50} de $0,28 \mu\text{M}$.¹¹⁰

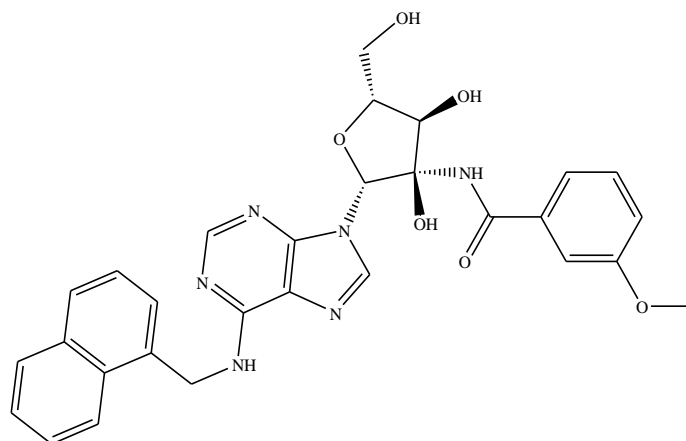


Figura 22. Representação da estrutura molecular da N^6 -(1-naftalenometil)-2'-(3-metoxi-benzamido)adenosina.

6.4. Enzimas envolvidas na via da tripanotiona

A tripanotiona ($T(SH)_2$) é uma molécula essencial no controlo do stresse oxidativo em *Trypanosoma* e *Leishmania*. É crucial para manter o potencial redox celular e, como tal, é essencial para a sobrevivência do parasita. Assim, a via da tripanotiona tornou-se o foco de estudo de novos fármacos anti-tripanosomatídeos. A via da tripanotiona é catalisada por duas enzimas, a tripanotiona sintetase (TS) e a tripanotiona redutase (TR). A biosíntese da tripanotiona (Fig. 23), catalisada pela TS, é efetuada a partir de duas moléculas de glutathiona e uma de espermidina. Em seguida, a tripanotiona é reduzida pela enzima TR na presença de NADPH.¹¹¹

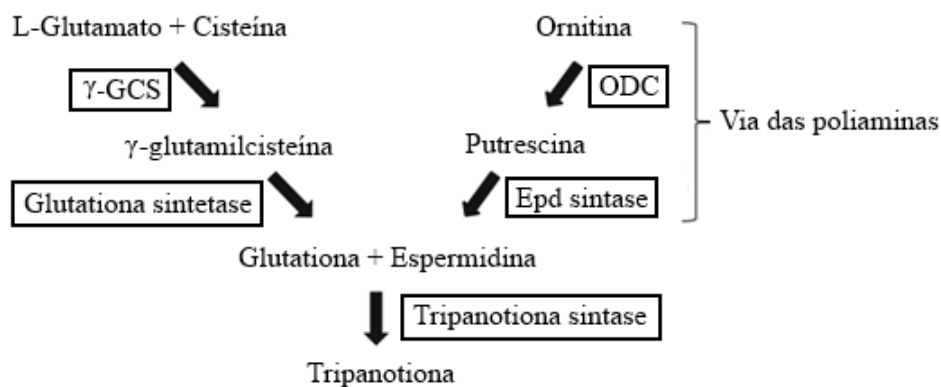


Figura 23. Via da tripanotiona. A figura mostra um esquema da síntese de tripanotiona, partindo de glutathiona e espermidina, em tripanossomatídeos. γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetase; ODC: Ornitina descarboxilase.

Num estudo sobre *Leishmania*, foi proposto que a $T(SH)_2$, é capaz de converter NO e Fe^{II} no complexo dinitrosil ferro, estável e inofensivo e com uma afinidade 600 vezes maior que a da glutathiona redutase (GR) em mamífero. Através deste processo de destoxificação, o parasita é protegido contra moléculas letais de NO.¹¹² Outro estudo mostrou que a utilização de mutantes *L.donovani* e *L.major* nulos para a TR atenua a infectividade e diminui a capacidade de sobrevivência dentro de macrófagos.¹¹³ Entretanto, a TR é semelhante tanto na sequência como na estrutura da GR humana. Contudo, a TR mostra cinco alterações não conservadoras no seu sítio ativo, que lhe

conferem uma carga global negativa, aumentando a especificidade da enzima para o seu substrato.¹¹⁴ Esta diferença na especificidade do substrato permitiu a síntese de inibidores específicos contra o parasita. Muitos dos compostos que inibem a TR foram identificados, incluindo, os derivados de poliaminas, compostos tricíclicos e aminobifenil sulfureto.¹¹⁵

A T(SH)₂ é um co-fator da proteína dissulfeto isomerase (PDI) e foi identificada como um potencial fator de virulência em *Leishmania major* (*LmPDI*). Verificou-se experimentalmente que parasitas de *L. major* deficientes em *LmPDI* perderam a virulência. Assim, a *LmPDI* mostrou ser um alvo promissor para a quimioterapia anti-leishmaniose. Num estudo, a bacitracina (Fig. 24) mostrou inibir a atividade isomerase e redutase da *LmPDI* e bloquear *in vitro* o crescimento de promastigotas e a multiplicação de amastigotas dentro dos macrófagos, com valores de CE₅₀ de 39 µM. Deste modo, a *LmPDI* representa ser um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos anti-leishmaniose.¹¹⁶

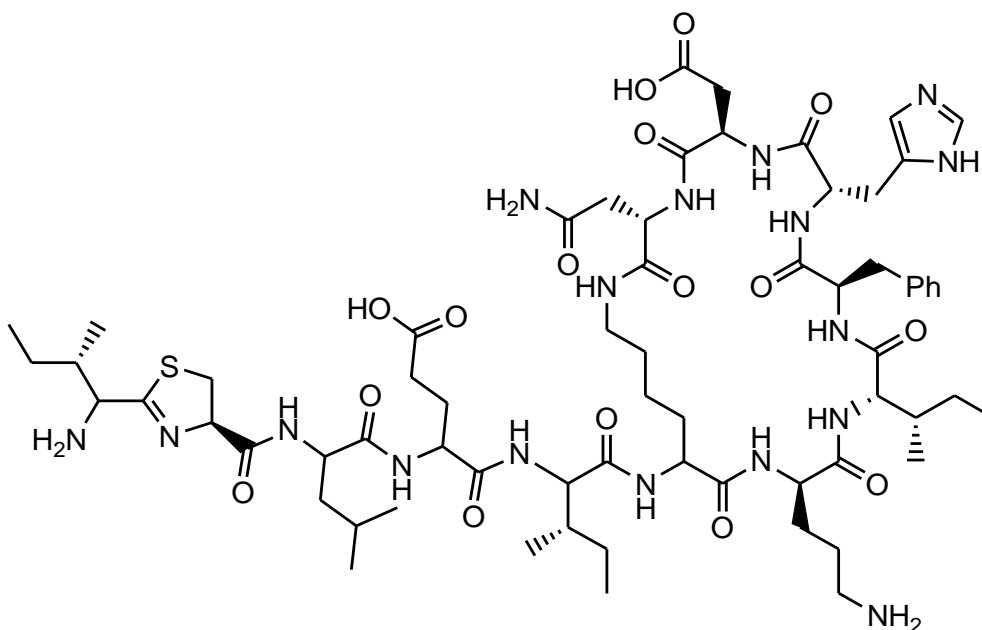


Figura 24. Representação da estrutura molecular da bacitracina.

6.5. Cinases dependentes de ciclina

As cinases dependentes de ciclina (CDKs) desempenham funções essenciais na sinalização celular e controle do ciclo celular, e por isto são enzimas investigadas como potenciais alvos terapêuticos em muitos parasitas, incluindo *Leishmania*.¹¹⁷ Duas CDKs de *L. mexicana*, *LmexCRK1* e *LmexCRK3*, mostraram ser essenciais para a formas promastigotas do parasita, uma vez que as tentativas de gerar mutantes nulos da CRK3 resultaram na mudança na ploidia do parasita.¹¹⁸ Num estudo, foi demonstrado que alguns compostos conhecidos como inibidores da CRK3 inibiram o crescimento e a replicação *in vitro* de amastigotas de *L. donovani* em macrófagos peritoneais. Estes compostos pertencem a quatro classes químicas: as purinas 2,6,9-trissubstituídas, incluindo as purinas C-2- alquiladas; os indirubins; os paullones; e os inibidores não específicos da quinase derivados da estaurosporina.¹¹⁹ Assim, a CRK3 parece ser um alvo promissor no desenvolvimento de novos fármacos e, da mesma forma, outros CDKs devem também ser investigados como possíveis alvos.

6.6. Enzimas da biossíntese de esteróis

Os esteróis são constituintes importantes da membrana celular, sendo vitais para a função celular e para a manutenção da estrutura celular. Ao contrário das células de mamíferos, em que o colesterol é o principal esterol de membrana, nas espécies de *Leishmania* os principais esteróis endógenos são o ergosterol e o estigmasterol, pelo que a via de biossíntese de esteróis representada esquematicamente na Figura 25, pode ser estudada como alvo para o desenvolvimento de fármacos.¹⁰⁹

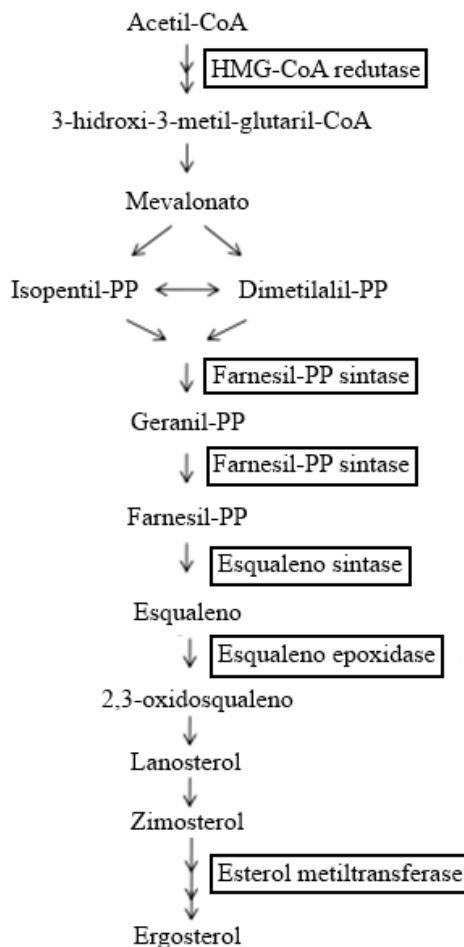


Figura 25. Representação esquemática da via de biossíntese de esteróis em *Leishmania*. A via mostra os passos importantes, e as enzimas envolvidas, na biossíntese de esterol. O produto final em tripanosomatídeos é o ergosterol, contrariamente às células de mamíferos que é o colesterol.

Uma das enzimas estudadas é a esqualeno sintase (EQS) que catalisa o primeiro passo da síntese de esteróis, o acoplamento de duas moléculas de farnesilo para formação do esqualeno. Dois derivados da quinuclidina, ER-119884 e E5700 (Fig. 26) demonstraram ser potentes e selectivos inibidores do crescimento de *Leishmania amazonensis*. A inibição da EQS por estes compostos levou a diminuição dos níveis endógenos de esterol do parasita, provocando um efeito antiproliferativo.¹²⁰

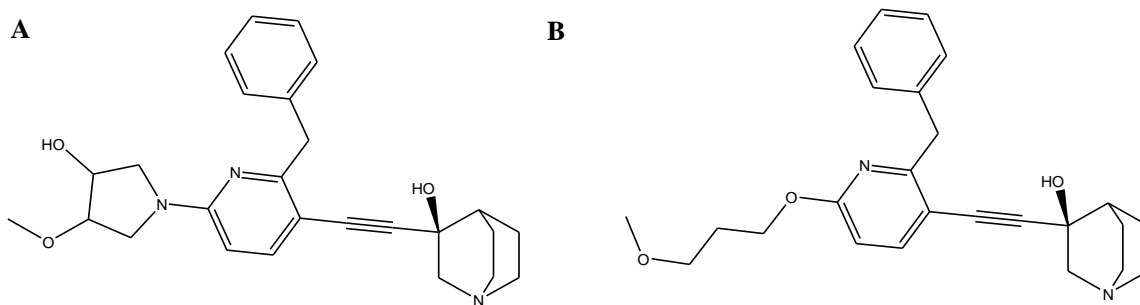


Figura 26. Representação da estrutura molecular de A) E5700 e B) ER-119884.

Outra enzima importante é a esqualeno epoxidase, que converte o esqualeno em 2,3-oxidosqualeno. A terbinafina (Fig. 27) é conhecida por inibir a esqualeno epoxidase. Um estudo demonstrou que a terbinafina inibiu o crescimento de promastigotas e amastigotas intracelulares e provocou alterações na organização estrutural na mitocôndria.¹²¹

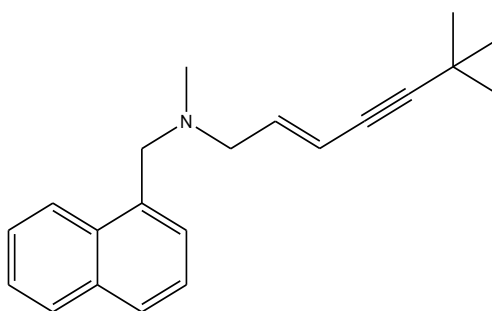


Figura 27. Representação da estrutura molecular da terbinafina.

Outro alvo importante na biosíntese do ergosterol é a enzima esterol metiltransferase (SMT). Esta enzima está presente apenas em tripanosomatídeos e ausente no hospedeiro humano. Portanto, esta enzima é um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos seletivos. Os azasteróis (Fig. 28) são conhecidos por inibir a SMT em *Candida sp.*¹²² Desta forma, o efeito dos azasteróis foi estudado em espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, e vários mostraram ter um efeito antiproliferativo em *L. amazonensis*. No entanto, alguns azasteróis que não foram bons inibidores da SMT mostraram também uma atividade antiproliferativa, sugerindo que podem existir outros modos de ação destes compostos.^{123,124}

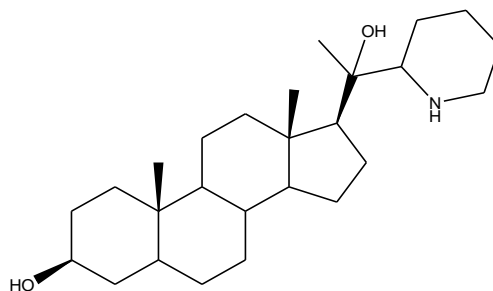


Figura 28. Representação da estrutura básica molecular dos azasteróis.

6.7. Enzimas envolvidas na biossíntese de folatos

Os folatos são co-factores importantes em vários processos metabólicos tais como a síntese de ADN e ARN e o metabolismo de aminoácidos. Uma vez que são essenciais para o crescimento, as enzimas envolvidas na sua síntese têm sido de interesse como alvos terapêuticos, em particular a timidilato sintase (TdS) e a dihidrofolato redutase (DHFR), que são responsáveis pela conversão da dihidrofolato em tetrahydrofolato, um co-factor importante na síntese da timina. Ambas as enzimas foram caracterizadas a partir de *L. major*.¹⁰⁹

Os inibidores conhecidos da DHFR foram considerados ineficazes contra a *Leishmania*.¹²⁵ Num estudo posterior, uma análise a alguns dos mutantes de *Leishmania* que eram resistentes ao metotrexato, um inibidor de DHFR-TdS, mostrou a existência do gene da pteridina redutase 1 (PTR1).¹²⁶ A PTR1 pode reduzir tanto as pterinas como os folatos e é muito menos suscetível à inibição por anti-folatos, como revelado em estudos estruturais dirigidos a DHFR. Portanto, a PTR1 pode acuar como uma via alternativa da DHFR-TdS. Isto indica que um composto com capacidade para inibir ambas as enzimas, ou dois compostos utilizados em combinação, para inibir especificamente cada uma das enzimas, aumentaria a eficácia leishmanicida.¹²⁷

6.8. Topoisomerases

As ADN topoisomerases são enzimas ubíquas, que desempenham um papel importante em muitos processos essenciais como a replicação de ADN, a transcrição, a

recombinação e a reparação. As ADN topoisomerases tem sido bastante estudadas nos últimos anos como alvos no desenvolvimento de fármacos para quimioterapia do cancro. As ADN topoisomerases são geralmente classificadas como topoisomerases do Tipo I e do Tipo II que clivam o ADN de cadeia simples e de cadeia dupla, respetivamente. As topoisomerases do Tipo I de *L. donovani* e *T. cruzi*, foram caracterizadas como sendo enzimas independentes de ATP.¹²⁸

A camptotecina (Fig. 29), um alcaloide, é conhecida por inibir a topoisomerase I eucariótica, mas verificou-se também atividade inibidora em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. donovani*. Desta forma, foram desenvolvidos análogos da camptotecina com alterações estruturais, para uma inibição mais específica da topoisomerase I do parasita.¹²⁹ Um estudo avaliou as atividades leishmanicidas da camptotecina e três análogos utilizados na quimioterapia do cancro: topotecano, gimatecano (Fig. 29) e o irinotecano. O gimatecano e a camptotecina foram os compostos que mostraram melhores resultados, impedindo o crescimento das células promastigotas de *L. infantum*.¹³⁰

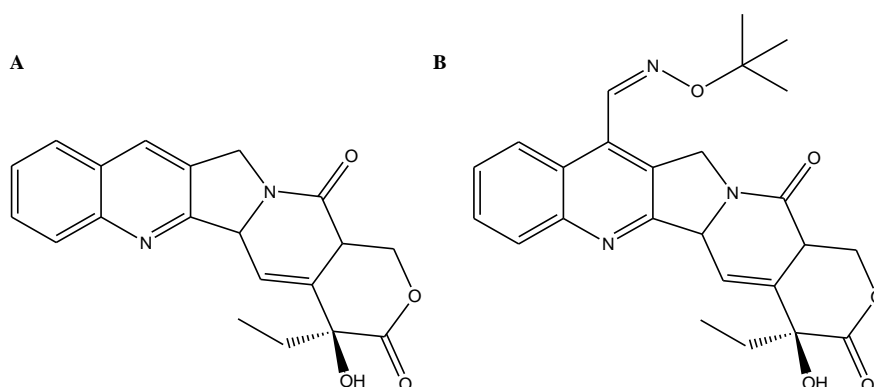


Figura 29. Representação da estrutura molecular da A) camptotecina e do B) gimatecano.

Foram identificadas topoisomerase II em *T. brucei*,¹³¹ *T. cruzi*¹³² e de *L. donovani*.¹³³ A 9-anilinoacridina (Fig.30), um inibidor da topoisomerase II utilizado como agente anti-tumoral, e outros derivados da acridina, mostraram inibir fortemente a *Leishmania* e *Trypanosoma*.¹³⁴

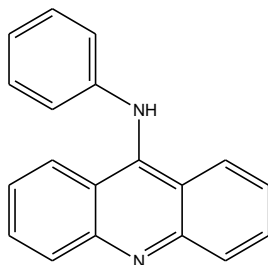


Figura 30. Representação da estrutura molecular da 9-anilinoacridina.

O ácido dihidrobetulínico (ADHB; Fig. 31), um derivado de ácido betulínico, mostrou ser ativo contra as topoisomerase I e II, e inibiu o crescimento de promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* com uma CI_{50} de 2,6 e 4,1 μM , respetivamente.¹³⁵

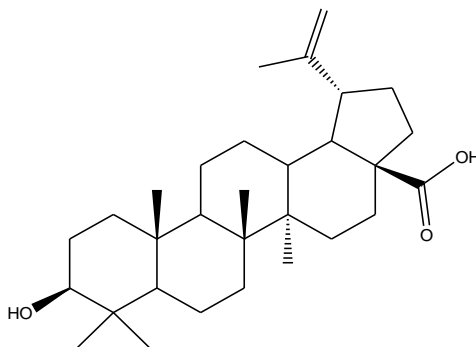


Figura 31. Representação da estrutura molecular do ácido dihidrobetulínico (ADHB).

Contudo, só a análise estrutural destas enzimas nos dará uma visão sobre seus mecanismos catalíticos e permitirá o desenvolvimento de inibidores específicos contra a *Leishmania*.

7. Conclusão

Até ao momento o tratamento para a leishmaniose é baseado em quimioterapia que está limitada a um grupo pequeno de fármacos que apresentam limitações graves, como alto custo e toxicidade, difícil via de administração e fraca eficácia em áreas endémicas, devido à crescente seleção de resistência. Para muitos deles, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Deste modo, o desenvolvimento de novos fármacos para esta doença é crucial e urgente.

Estudos mostraram grande interesse em melhorar fármacos atualmente disponíveis, no que diz respeito ao esclarecimento do seu modo de ação, utilização de novas combinações de fármacos, modificações estruturais da molécula e no desenvolvimento de novas formulações, baseadas em lipossomas e ciclodextrinas, de modo a aumentar a biodisponibilidade, diminuir a toxicidade e contornar ou retardar a seleção de resistência.

Fármacos utilizados no tratamento de outras patologias e compostos isolados de extratos de plantas foram testados e mostraram atividade contra a *Leishmania*. Contudo, serão necessários mais estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos.

No que se refere ao desenvolvimento de novos fármacos, tem-se verificado uma evolução relevante na identificação de inibidores para os vários alvos terapêuticos identificados. Numa primeira abordagem, a descoberta de novos fármacos é feita a partir de uma seleção aleatória de compostos. Entretanto, os avanços científicos e tecnológicos, principalmente na área da genética, da proteómica e da metabolómica, levaram a uma extensa pesquisa das vias bioquímicas e metabólicas que são essenciais para a sobrevivência do parasita, de modo a identificar novos alvos terapêuticos, como proteínas, enzimas e vias metabólicas, com características únicas. Várias vias metabólicas foram discutidas aqui, as quais foram identificadas como potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos anti-leishmaniose. Contudo, os inibidores identificados, e aqui referidos, para estas vias metabólicas, necessitam de mais estudos e de otimização estrutural, de modo a aumentar a sua eficácia e especificidade.



Leishmaniose: Tratamento atual e perspectivas de novos fármacos

Concluindo, é necessário recorrer à tecnologia contemporânea disponível para o desenvolvimento de fármacos e ter em conta as informações disponíveis sobre os processos biológicos do parasita, de modo a desenvolver fármacos eficazes para combater este grupo de doenças endémicas, consideradas pela OMS como negligenciadas.

8. Bibliografia

1. Organização Mundial de Saúde - OMS. Leishmaniose. em <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>
2. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Leishmaniasis. em <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>
3. National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID. Leishmaniasis Life Cycle. em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/Pages/lifecycle.aspx>>
4. Mitropoulos, P., Konidas, P. & Durkin-Konidas, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* **63**, 309–22 (2010).
5. Kedzierski, L. *et al.* Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* **16**, 599–614 (2009).
6. Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* **6**, 849–54 (2001).
7. Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B. & Sereno, D. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol. Res.* **109**, 1225–32 (2011).
8. Frézard, F., Demicheli, C. & Ribeiro, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* **14**, 2317–36 (2009).
9. Masmoudi, A., Hariz, W., Marrekchi, S., Amouri, M. & Turki, H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J. Dermatol. Case Rep.* **7**, 31–41 (2013).
10. Roberts, W. L., Berman, J. D. & Rainey, P. M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1234–1239 (1995).
11. Dos Santos Ferreira, C. *et al.* Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals* **16**, 441–446 (2003).
12. Cunningham, M. L., Zvelebil, M. J. & Fairlamb, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur. J. Biochem.* **221**, 285–295 (1994).
13. Wyllie, S. & Fairlamb, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 257–267 (2006).

14. Sudhandiran, G. & Shaha, C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. *J. Biol. Chem.* **278**, 25120–25132 (2003).
15. Demicheli, C. *et al.* Oral Delivery of Meglumine Antimoniate- Cyclodextrin Complex for Treatment of Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 100–103 (2004).
16. Veeken, H., Ritmeijer, K., Seaman, J. & Davidson, R. A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. *Trop. Med. Int. Heal.* **5**, 312–317 (2000).
17. Alving, C. R. *et al.* Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2959–63 (1978).
18. New, R. R., Chance, M. L. & Heath, S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* **8**, 371–381 (1981).
19. Irie, T. & Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* **86**, 147–162 (1997).
20. Hirayama, F. & Uekama, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 125–141 (1999).
21. Shaked-Mishant, P., Ulrich, N., Ephros, M. & Zilberstein, D. Novel Intracellular Sbv Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **276**, 3971–3976 (2001).
22. Mego, J. L. Stimulation of intralysosomal proteolysis by cysteinyl-glycine, a product of the action of γ -glutamyl transpeptidase on glutathione. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **841**, 139–144 (1985).
23. Gainey, D., Short, S. & McCoy, K. L. Intracellular location of cysteine transport activity correlates with productive processing of antigen disulfide. *J. Cell. Physiol.* **168**, 248–254 (1996).
24. Fairlamb, A. H. & Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 695–729 (1992).
25. Ferreira, C. D. S. *et al.* Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biomaterials* **16**, 441–6 (2003).
26. Denton, H., McGregor, J. C. & Coombs, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem. J.* **381**, 405–12 (2004).

27. Torres, D. C. *et al.* Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 727–733 (2010).
28. Sereno, D. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2064–2069 (2001).
29. Chakraborty, A. K. & Majumder, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 605–611 (1988).
30. Demicheli, C., Frézard, F., Lecouvey, M. & Garnier-Suillerot, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1570**, 192–198 (2002).
31. Ferreira, C. D. S., Pimenta, A. M. D. C., Demicheli, C. & Frézard, F. Characterization of reactions of antimoniate and meglumine antimoniate with a guanine ribonucleoside at different pH. *BioMetals* **19**, 573–581 (2006).
32. Das, V. N. R. *et al.* A Randomized Clinical Trial of Low Dosage Combination of Pentamidine and Allopurinol in the Treatment of Antimony Unresponsive Cases of Visceral Leishmaniasis. *J. Assoc. Physicians India* **49**, 609–613 (2001).
33. Andersen, E. M. *et al.* Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**, 133–137 (2005).
34. Soto, J., Buffet, P., Groggl, M. & Berman, J. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 107–111 (1994).
35. Romero, G. A. S., De Farias Guerra, M. V., Paes, M. G. & De Oliveira Macêdo, V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 456–465 (2001).
36. Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B. & Hatz, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 158–166 (2004).
37. Kandpal, M. & Tekwani, B. L. Polyamine transport systems of *Leishmania donovani* promastigotes. *Life Sci.* **60**, 1793–1801 (1997).
38. Basselin, M., Lawrence, F. & Robert-Gero, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochem. J.* **315** (Pt 2, 631–634 (1996).
39. Singh, N., Kumar, M. & Singh, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **5**, 485–97 (2012).

40. Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A. & De Koning, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends Parasitol.* **19**, 232–239 (2003).
41. Croft, S. L. & Olliario, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1478–1483 (2011).
42. Chattopadhyay, A. & Jafurulla, M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 7–12 (2011).
43. Ejazi, S. A. & Ali, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **11**, 79–98 (2013).
44. Balasegaram, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **17**, 493–510 (2012).
45. Sinha, P. K. *et al.* Effectiveness and safety of liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis under routine program conditions in Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 357–64 (2010).
46. Sinha, P. K. *et al.* Liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clin. Infect. Dis.* **53**, (2011).
47. Murray, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2**, 279–292 (2004).
48. Carneiro, G., Aguiar, M. G., Fernandes, A. P. & Ferreira, L. A. M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 1083–97 (2012).
49. Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K. & Rai, M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, (2006).
50. Soto, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 1266–1272 (2004).
51. Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S. & Gamarro, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2397–2403 (2003).
52. Croft, S. L., Sundar, S. & Fairlamb, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 111–126 (2006).
53. Mishra, J., Saxena, A. & Singh, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1153–1169 (2007).

54. Croft, S. L. & Coombs, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**, 502–508 (2003).
55. Davis, A. J. & Kedzierski, L. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **6**, 163–169 (2005).
56. Fernández, M. M., Malchiodi, E. L. & Algranati, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania Mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 86–93 (2011).
57. Kanyok, T. P., Killian, A. D., Rodvold, K. A. & Danziger, L. H. Pharmacokinetics of intramuscularly administered aminosidine in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 982–986 (1997).
58. Bryceson, A. D. M., Murphy, A. & Moody, A. H. Treatment of “Old World” cutaneous leishmaniasis with aminosidine ointment: results of an open study in London. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 226–228 (1994).
59. Sundar, S., Jha, T. & Thakur, C. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. ... *Engl. J.* ... 2571–2581 (2007). at <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:new+england+journal#2>
60. Sundar, S. & Chatterjee, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* **123**, 345–352 (2006).
61. Jha, T. K. *et al.* A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 1005–1011 (2005).
62. Wasunna, M. K. *et al.* A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 871–876 (2005).
63. Loiseau, P., Cojean, S. & Schrével, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite* **18**, 115–119 (2011).
64. Carvalho, L. *et al.* The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4204–10 (2011).
65. Yang, D. M. & Liew, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* **106** (Pt 1, 7–11 (1993).
66. Avery, M. A. *et al.* Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 8. Design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of artemisinin-based drugs against leishmaniasis and malaria. *J. Med. Chem.* **46**, 4244–4258 (2003).

67. Chollet, C., Crousse, B., Bories, C., Bonnet-Delpon, D. & Loiseau, P. M. In vitro antileishmanial activity of fluoro-artemisinin derivatives against *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* **62**, 462–5 (2008).
68. Al-Mutairi, N. *et al.* Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *Int. J. Dermatol.* **48**, 862–9 (2009).
69. Calvopina, M. & Guevara, A. Itraconazole in the treatment of New World mucocutaneous leishmaniasis. *Int. J. ...* 659–663 (2004). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2004.02183.x/full>>
70. Baroni, a *et al.* Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. *Dermatol. Ther.* **22 Suppl 1**, S27–9 (2009).
71. Al-Abdely, H. M., Graybill, J. R., Loebenberg, D. & Melby, P. C. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2910–2914 (1999).
72. Suzuki, H. *et al.* Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 135–141 (2000).
73. Arevalo, I. *et al.* Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1847–51 (2001).
74. Miranda-Verástegui, C., Llanos-Cuentas, a, Arévalo, I., Ward, B. J. & Matlashewski, G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1395–403 (2005).
75. Pfaller, M. A. & Marr, J. J. Antileishmanial effect of allopurinol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 496–472 (1974).
76. Martinez, S., Gonzalez, M. & Vernaza, M. E. *Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate.* *Clin. Infect. Dis.* **24**, 165–169 (1997).
77. Martinez, S. & Marr, J. J. *Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis.* *N. Engl. J. Med.* **326**, 741–744 (1992).
78. Velez, I. *et al.* Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis: A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **126**, 232–236 (1997).
79. Mäntylä, A. *et al.* Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 3497–502 (2004).

80. Garnier, T. *et al.* In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 802–10 (2007).
81. Garnier, T. *et al.* Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 41–9 (2007).
82. Reimão, J. Q., Colombo, F. a, Pereira-Chioccola, V. L. & Tempone, A. G. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Exp. Parasitol.* **130**, 195–9 (2012).
83. Fournet, A. & Muñoz, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 1215–1237 (2002).
84. Maes, L. *et al.* Comparative activities of the triterpene saponin Maesabalide III and liposomal amphotericin B (AmBisome) against *Leishmania donovani* in Hamsters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2056–2060 (2004).
85. Flores, N. *et al.* Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Med.* **73**, 206–211 (2007).
86. Lakshmi, V. *et al.* In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine* **14**, 36–42 (2007).
87. Tasdemir, D. *et al.* Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1352–1364 (2006).
88. Tavares, J., Ouaiissi, A., Lin, P. K. T., Tomás, A. & Cordeiro-Da-Silva, A. Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Int. J. Parasitol.* **35**, 637–646 (2005).
89. Vannier-Santos, M. A., Menezes, D., Oliveira, M. F. & de Mello, F. G. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* **154**, 3104–3111 (2008).
90. Roberts, S. C. *et al.* *Leishmania donovani* polyamine biosynthetic enzyme overproducers as tools to investigate the mode of action of cytotoxic polyamine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 438–445 (2007).
91. Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S. & Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **52**, 2603–2612 (2009).
92. Bitonti, a J. *et al.* Cure of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections in mice with an irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1485–90 (1990).

93. Roberts, S. C. *et al.* S-adenosylmethionine decarboxylase from *Leishmania donovani*. Molecular, genetic, and biochemical characterization of null mutants and overproducers. *J. Biol. Chem.* **277**, 5902–9 (2002).
94. Heby, O., Persson, L. & Rentala, M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids* **33**, 359–66 (2007).
95. Kaur, K., Emmett, K., McCann, P. P., Sjoerdsma, A. & Ullman, B. Effects of DL-alpha-difluoromethylornithine on *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Protozool.* **33**, 518–521 (1986).
96. Reguera, R. M., Fouce, R. B., Cubria, J. C., Alvarez Bujidos, M. L. & Ordonez, D. Fluorinated analogues of L-ornithine are powerful inhibitors of ornithine decarboxylase and cell growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Life Sci.* **56**, 223–230 (1995).
97. Hanson, S., Adelman, J. & Ullman, B. Amplification and molecular cloning of the ornithine decarboxylase gene of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **267**, 2350–9 (1992).
98. Khomutov, a R. Inhibition of enzymes of polyamine biosynthesis by substrate-like O-substituted hydroxylamines. *Biochem. Biokhimiia* **67**, 1159–67 (2002).
99. Singh, S. *et al.* Antileishmanial effect of 3-aminooxy-1-aminopropane is due to polyamine depletion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 528–34 (2007).
100. Fear, G., Komarnytsky, S. & Raskin, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacol. Ther.* **113**, 354–368 (2007).
101. Drag, M. & Salvesen, G. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701 (2010).
102. Das, P. *et al.* Protease inhibitors in potential drug development for Leishmaniasis. *Indian J. Biochem. Biophys.* **50**, 363–76 (2013).
103. Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K. & Shio, M. T. *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* **14**, 1377–1389 (2012).
104. Silva-Almeida, M., Pereira, B. A. S., Ribeiro-Guimarães, M. L. & Alves, C. R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit. Vectors* **5**, 160 (2012).
105. Bryson, K. *et al.* Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. *Infect. Immun.* **77**, 2971–8 (2009).

106. Alexander, J., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. Leishmania mexicana cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J. Immunol.* **161**, 6794–801 (1998).
107. Mahmoudzadeh-Niknam, H. & McKerrow, J. H. Leishmania tropica: Cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp. Parasitol.* **106**, 158–163 (2004).
108. Silva-Lopez, R. E., Morgado-Díaz, J. a, Chávez, M. a & Giovanni-De-Simone, S. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes. *Parasitol. Res.* **101**, 1627–35 (2007).
109. Chawla, B. & Madhubala, R. Drug targets in Leishmania. *J. Parasit. Dis.* **34**, 1–13 (2010).
110. Aronov, a M. *et al.* Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4273–8 (1999).
111. Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **227**, 1485–1487 (1985).
112. Ascenzi, P., Bocedi, A. & Visca, P. Catalytic properties of cysteine proteinases from Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum: a pre-steady-state and steady-state study. *Biochem. ...* **309**, 659–665 (2003).
113. Dumas, C. *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* **16**, 2590–8 (1997).
114. Zhang, Y. *et al.* The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen Trypanosoma cruzi at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **5**, 52–61 (1996).
115. Werbovetz, K. a. Target-based drug discovery for malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* **7**, 835–60 (2000).
116. Ben Khalaf, N., De Muylder, G., Louzir, H., McKerrow, J. & Chenik, M. Leishmania major protein disulfide isomerase as a drug target: enzymatic and functional characterization. *Parasitol. Res.* **110**, 1911–7 (2012).
117. Doerig, C., Meijer, L. & Mottram, J. C. Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends Parasitol.* **18**, 366–371 (2002).
118. Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K. M. & Mottram, J. C. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of Leishmania mexicana. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**, 189–98 (2001).

119. Grant, K. M. *et al.* Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: Chemical library screen and antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3033–3042 (2004).
120. Fernandes Rodrigues, J. C. *et al.* In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4098–4114 (2008).
121. Vannier-Santos, M. A., Urbina, J. A., Martiny, A., Neves, A. & de Souza, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 337–346
122. Ishida, K. *et al.* Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by Delta24(25)-sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-albicans organisms. *BMC Microbiol.* **9**, 74 (2009).
123. Lorente, S. O. *et al.* Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2937–50 (2004).
124. Magaraci, F. *et al.* Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Chem.* **46**, 4714–27 (2003).
125. Neal, R. A. & Croft, S. L. An in-vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **14**, 463–475 (1984).
126. Nare, B., Luba, J., Hardy, L. W. & Beverley, S. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. *Parasitology* **114 Suppl**, S101–S110 (1997).
127. Hardy, L. W., Matthews, W., Nare, B. & Beverley, S. M. Biochemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. *Exp. Parasitol.* **87**, 157–169 (1997).
128. Das, A., Dasgupta, A., Sengupta, T. & Majumder, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol.* **20**, 381–7 (2004).
129. Bodley, A. L., Wani, M. C., Wall, M. E. & Shapiro, T. a. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 937–942 (1995).
130. Prada, C. F. *et al.* Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1433–40 (2013).
131. Strauss, P. R. & Wang, J. C. The TOP2 gene of *Trypanosoma brucei*: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 141–150 (1990).

132. Fragoso, S. P. & Goldenberg, S. Cloning and characterization of the gene encoding Trypanosoma cruzi DNA topoisomerase II. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**, 127–134 (1992).
133. Das, A. *et al.* Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from Leishmania donovani: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1844–1851 (2001).
134. Figgitt, D., Denny, W., Chavalitsheewinkoon, P., Wilairat, P. & Ralph, R. In vitro study of anticancer acridines as potential antitrypanosomal and antimalarial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1644–7 (1992).
135. Chowdhury, A. R. *et al.* Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in Leishmania donovani by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanial therapy. *Mol. Med.* **9**, 26–36 (2003).