

Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares

Eric de Souza Gil¹

Luiz Carlos Cunha²

José Realino de Paula³

José Clecildo Barreto Bezerra⁴

Fabio Alves Aguiar⁵

Abstract

Leishmaniasis: Therapeutic Options and Molecular Targets

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoan genus *Leishmania*. It is an endemic illness that encloses 80 countries, including some of European continent and more than, mainly, underdeveloped or in development countries. In this revision it is discussed on the old and current therapeutical options, focusing mechanisms of action and resistance, pharmacokinetics, toxicity and potential specific molecular sites of the parasites (e.g.: enzymatic and transport systems, glycosomes, heme group, tubulin proteins), for which antileishmanial activity is possible to carry through rational approach in the new drugs development. Additionally, the attempts of application of other pharmacological groups in the treatment of leishmaniasis are cited (e.g.: antineoplastic drugs, organometalic substances derivatives of iridium and the rhodium, quinolinic substances, imidazolic derivatives, natural products and other chemotherapeutical drugs).

Keywords: *leishmaniasis, antileishmaniasis; action mechanisms*

Palavras Chaves: *leishmaníase, leishmanicidas, mecanismo de ação*

¹ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás;

² Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás;

³ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás;

⁴ Instituto de Pesquisa em Doenças Tropicais (IPTESP)- UFG;

⁵ Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ.

INTRODUÇÃO

Calazar indiano, botão do oriente, ferida brava, úlcera de Bauru, uta e úlcera dechiclero são alguns dos nomes populares de lesões associadas a Leishmaníase. Afeta mais de 80 países, sendo que cerca de 1,5 bilhão de pessoas se encontram em áreas de risco, 12 milhões de pessoas infectadas e mais de 400.000 casos são reportados anualmente (AMATO et al, 200; DARDARI et al, 2004).

No Brasil, a Leishmaníase atinge 19 estados, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença se concentram na região nordeste, havendo ainda focos importantes na região Centro-Oeste, Norte e Sudeste.

Embora apresente baixa mortalidade, apresenta alta morbidade, intensificando ainda mais sua associação as desigualdades sociais, já que reduz drasticamente a qualidade de vida dos infectados.

Entre as principais causas do aumento da incidência, temos a devastação das florestas e aumento da população, falta de saneamento e higiene, bem como imunossupressão e desnutrição, que implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro (ASHFORD, 2000).

As manifestações clínicas da doença são variáveis, dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções. Podendo ser dividida em três grupos principais (DARDARI et al, 2004).

i) Leishmaníase visceral: conhecida como Calazar, é a forma mais grave, sendo sistêmica pode atingir fígado, baço e medula óssea, levando o paciente à morte.

ii) Leishmaníase cutânea caracteriza-se por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor.

iii) Leishmaníase mucocutânea caracteriza-se por úlceras crônicas similares a forma cutânea, porém tendem a reaparecer mesmo após cicatrização em mucosas do nariz e da boca, em geral associadas a infecções secundárias levando a destruição de grandes extensões de tecido.

ARSENAL TERAPÊUTICO

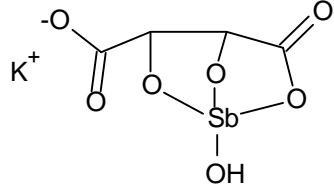
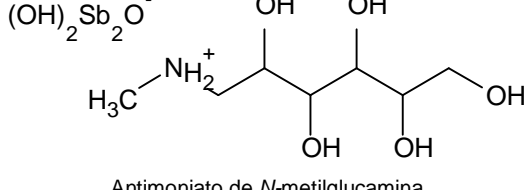
O arsenal terapêutico disponível para tratamento da Leishmaníase é bastante precário existindo, até o presente momento, dois grupos de medicamentos em uso: os antimoniais e os não-antimoniais.

O tratamento básico da doença consiste na administração de estibogluconato sódico (Pentostan®), antimoniato de *N*-metil-glucamina (Glucantime®), ambos drogas de primeira geração e pentamidina ou anfotericina B, ambos de segunda geração (DEMICHELI et al, 2002; SERENO et al, 2000).

2.1 ANTIMONIAIS

Embora sejam os fármacos de primeira escolha, apresentam eficácia limitada e algumas vezes significativa toxicidade e efeitos adversos (AMATO et al, 2000).

Dentre os compostos antimoniais (Fig. 1), destacam-se os complexos de antimônio trivalentes tais como o tartarato antimônio de potássio (Tartarato emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®) e tioglicolato de sódio e antimônio, bem como antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®, antimoniato de meglumina), gluconato de antimônio(V) sódico (Pentostan®, Solustibosan®, estibogluconato sódico) e uréia estibamina (Estibamine) (RATH et al, 2003). Entretanto, devido a cardiotoxicidade e intolerância gastrointestinal dos antimoniais trivalentes, Sb(III), são os antimoniais pentavalentes, Sb(V) que apresentam maior uso terapêutico. Entre os medicamentos antimoniais mais consumidos no mundo, destacam-se o Pentostan® (Glaxo Wellcome), Glucantime® (Rhône-Poulenc-Rohrer) e ou Solustibosan® (Bayer) (SERENO et al, 2000).

Antimoniais Trivalentes (Sb ^{III})	Antimoniais Pentavalentes (Sb ^V)
 <p style="text-align: center;">Tartarato emético</p>	 <p style="text-align: center;">Antimoniato de <i>N</i>-metilglucamina</p>

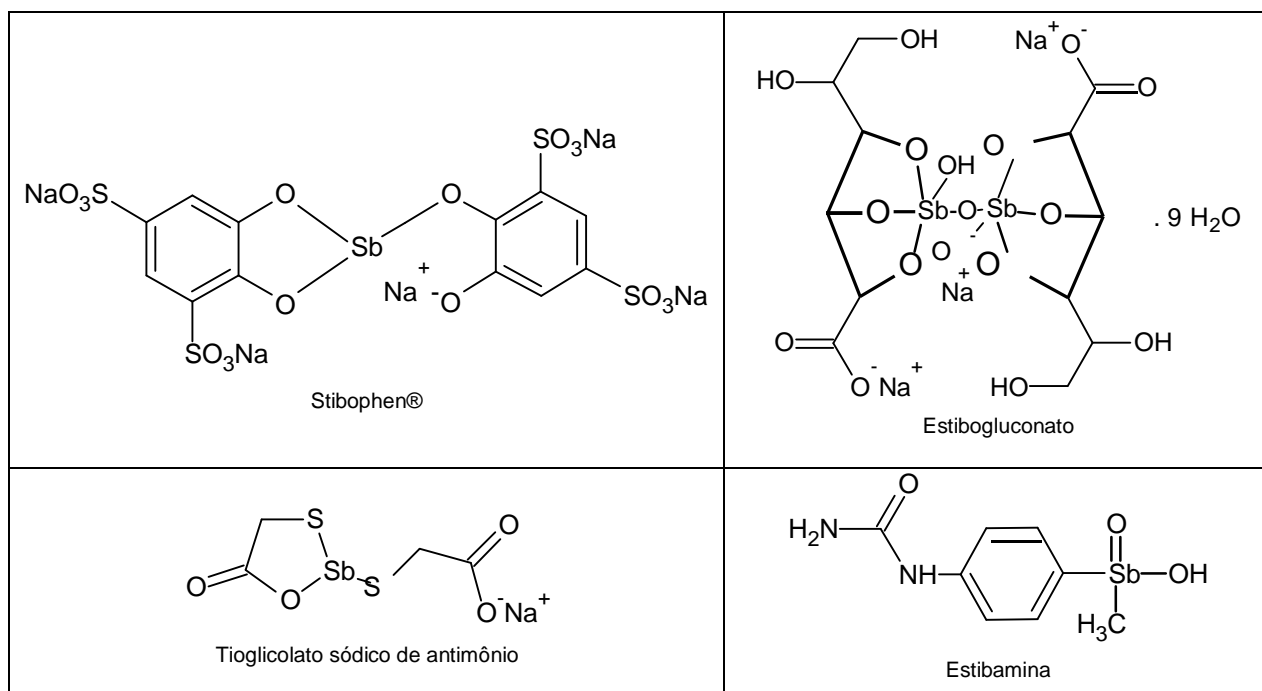


Fig. 1 – Estrutura química de antimoniais leishmanicidas

O Glucantime® é produzido e comercializado em países de língua francesa e espanhola, enquanto o Pentostan® é distribuído principalmente nos países de língua inglesa.

No Brasil o medicamento antimonial de escolha é o antimoniato de *N*-metilglucamina, o qual, se administrado de forma contínua e posologicamente adequada, é eficaz ao tratamento dos três grupos de leishmaníase. Por sua vez, baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes (RATH et al, 2003).

A farmacocinética de antimoniais pentavalentes administrados via intramuscular pode ser dividida em três fases, sendo a fase inicial de absorção com meia vida de 0,85h, seguida por uma fase de eliminação rápida com meia vida de 2,02h e finalmente, uma fase de eliminação mais lenta com meia vida de cerca de 76 h. Por outro lado, quando administrado intravenosamente, cerca de 80% do antimonial pentavalente é eliminado em até 8h.

A combinação entre antimoniais e interferon-gama ou alopurinol, tem sido proposta como alternativa para melhora da eficácia terapêutica destes compostos (AMATO et al, 2000).

Mecanismo de Ação e Resistência

O mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes no combate a *Leishmania* é ainda controverso e pouco compreendido (CHAI et al, 2005).

Considerando o potencial de redução do Sb(V) em sistemas biológicos, o mecanismo de oxirredução é uma das hipóteses consideradas, sendo proposto a redução *in vivo* de complexos Sb(V) para compostos mais tóxicos de Sb(III).

Destaca-se ainda o papel de grupos tiol, comuns em biomoléculas contendo cisteína, que tem sido implicado nesta conversão (CHAI et al, 2005; DEMICHELI et al, 2002).

Entretanto, outros estudos indicam que o papel do Sb(III) estaria muito mais associado à toxicidade, que propriamente à atividade específica anti-leishmaníase (DZAMITIKA et al, 2006).

Por outro lado, tem sido proposto também, como mecanismo de ação, a capacidade do Sb(V) de formar complexos com nucleotídeos, interferindo no seu metabolismo e inibindo a topoisomerase do parasito (DEMICHELI et al, 2002). Esta hipótese é consolidada pelo fato de que os nucleosídeos e polinucleotídeos apresentam elevado número de funções oxigenadas e nitrogenadas, que se constituem em sítios doadores potenciais para íons metálicos.

Em contrapartida, ao contrário das células de mamíferos, os protozoários são incapazes de sintetizar purinas de novo. Para tanto, os parasitos utilizam mecanismos bioquímicos alternativos, que tem como ponto de partida a translocação de purinas pré-formadas. Esta estratégia de produção de purinas, exarcebada em *Leishmania*, pode também contribuir para formação de complexos Sb(V)-purina, os quais por sua vez teriam influência deletéria em toda bioquímica do DNA (CHAI et al, 2005).

Estudos de cinética de formação de complexos entre misturas contendo antimoniato de potássio e derivados da adenina comprovam esta teoria. Constatou-se, por ressonância magnética (NMR) e dicroísmo circular (CD), a formação de complexos de Sb(V) com adenosina e adenosina monofosfato, predominantemente, via resíduo ribose. Este fato presume a possibilidade de interações com outras biomoléculas que contenham ribose, tais como guanina, uracila, citosina, hipoxantina, bem como alguns dinucleotídeos (DEMICHELI et al, 2002).

Outra hipótese aventada, diz respeito a formação de complexos entre Sb(V) e guanosina 5'-difosfato-*D*-manose (5'-GDP) ou outros glicoconjugados ricos em

manose, sintetizados por este parasito e amplamente distribuídos sobre sua superfície celular. Por sua vez, a formação mono-adutos e bis-adutos entre Sb(V) e 5'-GDP-manose ou outros glicoconjugados interfere na virulência do parasito (CHAI et al, 2005).

Outra associação que se faz ao provável mecanismo de ação dos compostos metálicos em geral diz respeito à inibição da enzima superóxido dismutase (SOD), cuja atividade e importância aumentam em parasitos infectantes. Tal inibição levaria por sua vez, a um aumento do nível de radicais superóxido e morte do parasito (RAYCHAUDHURY et al, 2005).

Outrossim, a maioria dos estudos relatados é voltada a formas promastigotas, as quais são predominantes no vetor, sendo que o estudo com formas amastigotas seria clinicamente mais relevante, já que esta é a forma predominantemente infectante em humanos.

Neste contexto, o estudo com linhagens resistentes de formas amastigotas pode também ajudar a elucidar estes mecanismos (SERENO et al, 2000).

Quanto ao desenvolvimento da resistência, observa-se que uma vez estabelecida para complexos trivalentes, há alta incidência de resistência cruzada para complexos pentavalentes, porém surpreendentemente há aumento da susceptibilidade a drogas de segunda geração como pentamidina e anfotericina B (SERENO et al, 2000).

Uma possível explicação para este fato está no envolvimento de sistemas de transporte distintos para compostos antimoniais e fármacos orgânicos (DZAMITIKA et al, 2006; OUELLETTE et al, 1998).

Pentamidina

A descoberta da atividade terapêutica desta diamida no tratamento da leishmaníase e outras parasitoses, pertencentes à mesma família, como a tripanossomíase gambiense ou rodesiana, é mais um exemplo da presença do acaso na descoberta de novos fármacos.

A pentamidina (*Fig. 2*) é a droga de segunda escolha, mais comumente recomendada, embora também apresente efeitos adversos significantes e requeira a administração parenteral. De caráter catiônico, pode apresentar-se na forma de isotionato ou cloridrato.

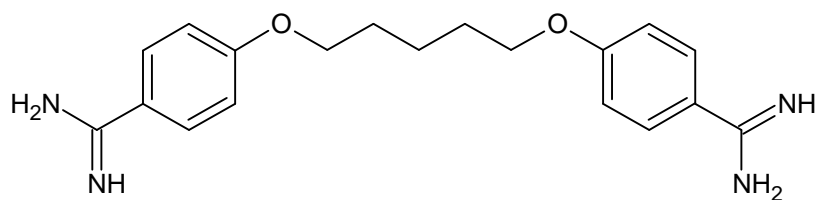


Fig. 2 – Estrutura química da pentamidina.

A pentamidina (Lomidina®) é uma molécula de grande interesse no tratamento de leishmaníase visceral e mucocutânea refratária a antimoniais pentavalentes (AMATO et al, 2000). A alta toxicidade desta droga, com relatos de morte repentina, é um fator limitante de seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos ou colaterais, estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH et al, 2003).

Para o mecanismo de ação da pentamidina a teoria mais aceita tem sido a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al, 2005).

Outra hipótese, diz respeito a interferência de diamidinas aromáticas (ex. berenil e pentamidina) sobre sistemas de transporte poliamínicos, biomoléculas de importância em vários processos bioquímicos da fisiologia celular (BASSELIN et al, 2000). O mecanismo molecular está associado à inibição não-competitiva da recaptura de poliaminas (ex. espermidina, espermina, putrescina e arginina) e inibição direta da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina, sendo que estudos quantitativos de relação estrutura atividade (QSAR) mostraram que a inibição da recaptura (*uptake*) é proporcional à distância entre grupos aminos dos substituintes amidino. Outro mecanismo proposto é a inibição direta da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina (REGUERA et al, 2005).

O mecanismo de resistência pode estar associado a um decréscimo do potencial da membrana mitocondrial com redução do acúmulo do fármaco em terapias prolongadas (MUKHERJEE et al, 2006).

Anfotericina B

A anfotericina B (Fig. 3), um antibiótico macrolídico, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, pertence ao grupo dos fármacos leishmanicidas de segunda geração e é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimonais. Apesar de sua elevada toxicidade e do fato de também requerer

administração parenteral, a anfotericina B tem sido proposta como agente terapêutico de escolha para leishmaníase visceral e infecção sistêmica por fungos (AMATO et al, 2000; SERENO et al, 2000).

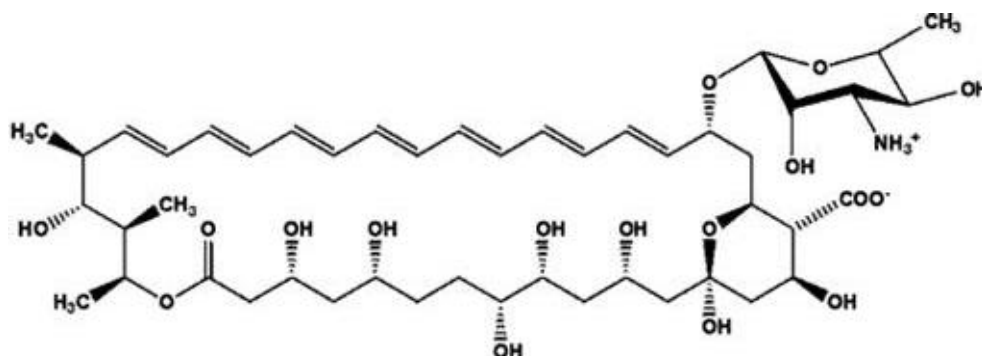


Fig. 3 – Estrutura química da Anfotericina B.

O mecanismo de ação, assim como da toxicidade, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito e hospedeiro, alterando a permeabilidade seletiva à cátions e levando à morte celular (COHEN, 1998). No caso da *Leishmania*, a letalidade do antibiótico é agravada por lise coloidal osmótica devido ao influxo iônico exacerbado. Já no caso dos fungos, embora a parede celular reduza este influxo osmótico, a alteração do pH interno devido a permeabilidade à H⁺/OH⁻, leva também a danos celulares (COHEN, 1998).

A anfotericina B também interfere na síntese do ergosterol, um importante componente de membrana (DOGRA & SAXENA, 1996).

ALVOS MOLECULARES POTENCIAIS

Falhas no tratamento especialmente no caso do calazar, leishmaníase cutânea difusa ou em áreas de mucosa, justificam maior número de contribuições focando novos alvos moleculares potenciais.

As falhas na terapia são ainda mais frequentes quando decorrentes de co-infecção com vírus HIV ou outras deficiências de natureza imunológica, fisiológica ou farmacológica. A partir do seqüenciamento do DNA da *Leishmania sp*, pretende-se chegar à descoberta de novas técnicas terapêuticas e de diagnóstico, vacinas e, principalmente, a novas drogas para o cão e para o homem (LORENET et al, 2005; PURI et al, 2005).

Uma estratégia racional para busca de novas moléculas antiparasitárias é a exploração das diferenças bioquímicas entre parasito e a célula do mamífero

hospedeiro. Outrossim, a filogenética indica que os tripanossomatídeos apesar de eucariotos apresentam diferenças consideráveis no que diz respeito à organização celular quando comparados a células de mamíferos (BARRET et al, 1999).

— interessante ressaltar que, dada a capacidade mutante destes parasitos, a idealização de inibidores menos específicos pode ser mais vantajosa (DOERIG et al, 2002).

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários flagelados unicelulares, digenéticos (heteroxênicos).

A reprodução destes parasitos se faz por fissão binária (Lainson, 1985), ocorrendo seja no interior do flebotomíneo vetor ou em macrófagos. Porém, como em outros tripanossomatídeos (Tait, 1980), tem sido observada a presença de organismos heterozigotos (Maazoun et al., 1981; Le Blanq et al., 1986; Bonfante-Garrido et al., 1992), bem como a formação de híbridos (Evans et al., 1987; Darce et al., 1991; Cupolillo et al., 1991), fusão celular entre organismos (Lanotte & Rioux, 1990) e a amplificação e/ou deleção de genes, sugerindo que a evolução destes parasitos esteja associada com recombinação genética (Cupolillo et al. 1997). No entanto, o conceito que ainda é mais aceito é de que a variabilidade genética em *Leishmania* depende essencialmente da ocorrência de mutações recorrentes (Lainson & Shaw, 1987).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o propósito de distinguir as espécies de *Leishmania* e entender as relações genéticas entre estes parasitos (Rioux et al 1986, Thomaz-Soccol et al 1993, Cupolillo et al 1994, 1995, 2000). Discussões quanto à origem destes parasitos e os mecanismos evolutivos envolvidos no processo de especiação, que resultam em diversidade genética, têm sido objeto de estudos recentes (Tibayrenc & Ayala, 1999, Noyes et al, 2000; Kerr et al, 2000^a e Kerr et al, 2000^b; Momen & Cupolillo, 2000; Gibson et al., 2000 e Stevens et al., 2001).

A diferenciação das espécies de *Leishmania* tem sido um desafio para muitos pesquisadores. A integração dos estudos de biologia molecular e genética evolutiva aplicados nas áreas de diagnóstico, tipagem de cepas, identificação de espécies, patogenicidade, variação antigênica, resistência à drogas e vacinas, e especificidade a hospedeiros e vetores é na verdade uma abordagem mais recente (Tibayrenc

1996). A genética evolutiva fornece diretrizes que auxiliam uma melhor interpretação de dados genéticos e moleculares relacionados com microorganismos.

Em *Leishmania*, como em outros patógenos, o desenvolvimento de ferramentas de caracterização molecular é especialmente útil na determinação da estrutura de população dos parasitos presentes nas diferentes áreas endêmicas. Sabe-se que regiões epidemiológicas distintas exibem diferentes populações de parasitos, com variação no nível de diversidade (Cupolillo *et al* 2003). A determinação de métodos de imunização apropriados deve considerar a diversidade antigênica dos agentes etiológicos encontrados nas áreas endêmicas. Além de fornecer informações relevantes sobre imunoproteção, a caracterização molecular é fundamental para determinar as relações genéticas entre os parasitos e pode ser uma ferramenta valiosa para determinação de alvos moleculares potenciais e desenvolvimento de novos fármacos.

Enfim, são alvos potenciais da ação de fármacos leishmanicidas, os sistemas de transporte para glicose, purinas e outras biomoléculas essenciais, bem como diversos sistemas enzimáticos importantes e específicos do parasito (BARRETT *et al*, 1999; DOERIG *et al*, 2002; PONTRE-SUCRE *et al*, 1998; MACHUCA *et al*, 2006; KAPOOR *et al*, 1999; UZCATEGUI *et al*, 2005; BURCHMORE & BARRETT, 2001).

Sistemas de Transporte

Os canais transmembranares e sistemas de transporte celular são alvos moleculares de destaque, já que estão associados não apenas a aspectos fisiológicos essenciais como absorção de nutrientes, como também ao mecanismo de resistência.

O transporte iônico é essencial para vários fenômenos fisiológicos em todos organismos, incluindo parasitos unicelulares e têm implicações inclusive no mecanismo de resistência. Em virtude da susceptibilidade de parasitos de *Leishmania sp* a bloqueadores associados a sistemas de transporte iônico K^+/Cl^- ou Na^+/H^+ , vários estudos tem sido realizados focando estes alvos (PONTRE-SUCRE *et al*, 1998).

A resistência de várias espécies de *Leshmania* está associada a um aumento da expressão gênica de sistemas de transporte ativo da família das proteínas transmembranares ABC. Fazem parte deste grupo de proteínas de transporte ativo transmembranar, o subgrupo MRP (P-glicoproteínas) e o subgrupo PgpA, a primeira

de maior similaridade à proteína humana é associada a mecanismos de multiresistência, já a segunda mais divergente no aspecto estrutural é específica a compostos antimonialis (LEANDRO & CAMPINO, 2003; OULLETTE et al, 1998).

O mecanismo de resistência inclui uma série de eventos celulares, dentre os quais o aumento da atividade destas proteínas transportadoras no efluxo de agentes quimioterápicos (MACHUCA et al, 2006). Tanto a extrusão ativa (efluxo), quanto a redução na absorção (influxo) contribuem para menor acúmulo intracelular dos agentes antimicrobianos e conseqüentemente redução da eficácia do quimioterápico (OULLETTE et al, 1998).

No caso de transportadores da família PgpA, a detoxicação especificamente para íons Sb(III) está associada predominantemente a redução no processo absorptivo, entretanto assim como ocorre na subfamília das P-glicoproteínas (MRP) o aumento do efluxo também é importante. Este efluxo por sua vez tem sido associado a aumento da atividade de bombas GS-X, as quais requerem como co-fatores biomoléculas ricas em grupos tióis, tais como glutatona e espermidina, ambas aumentadas em parasitos resistentes (OULLETTE et al, 1998).

Vários moduladores destes canais de transporte, incluindo verapamil, glibenclamida, ciclosporina, antagonistas da calmodulina, inibidores da proteína quinase, antibióticos, derivados hormonais, sesquiterpenos e flavonóides foram testados, no sentido de inibir crescimento microbiano, evitar mecanismos de resistência ou atuar em sinergia com compostos ativos (LEANDRO & CAMPINO, 2003; MACHUCA et al, 2006; KAPOOR et al, 1999).

Um inibidor destes canais ionóforos, incluindo os subtipos ABC1, AtMRP5 e P-glicoproteínas e outros sistemas de transporte de ânions bastante investigado recentemente, em cepas resistentes de *Leishmania*, é a glibenclamida. A glibenclamida, uma sulfoniluréia descrita como bloqueadora de canais de potássio ATP dependente, é originalmente utilizada como hipoglicemiante em seres humanos. Sua influência em enzimas chaves do ciclo de Krebs e na incorporação de substratos de carbono (ex. glicose, aminoácidos) foi investigada em parasitos resistentes, observando-se a capacidade destes em buscar alternativas metabólicas (UZCATEGUI et al, 2005). Outrossim, a glibenclamida apresentou efeitos inibitórios em concentrações da ordem de 3×10^{-6} M. Já a amilorida, um bloqueador de canais

Na⁺/H⁺ apresentou IC₅₀ que variou de 10 a 264 μM, dependendo da espécie de *Leishmania* (PONTRE-SUCRE et al, 1998).

Além de sistemas transmembranares ATP ou próton dependentes e canais ionóforos, os sistemas de transporte envolvem também biomoléculas de baixo peso molecular, como por exemplo as poliaminas catiônicas, espermidina e putrescina (BASSELIN et al, 2000). Estas poliaminas são sistemas de transporte versáteis do tipo multicomponente, sendo portanto fundamentais a proliferação celular. As poliaminas são requeridas ainda para síntese de tripanotona um importante antioxidante para a defesa do parasito a radicais livres (BURCHMORE & BARRET, 2001).

Sistemas Enzimáticos

Ornitina descarboxilase

Ainda no que diz respeito a sistemas de transporte, merece destaque a bioquímica das poliaminas catiônicas, biomoléculas essenciais para crescimento e proliferação celular em todos organismos vivos.

Poliaminas (ex. putrescina, espermidina e espermina) interagem intermolecularmente com macromoléculas (ácidos nucléicos, proteínas e lipídios), controlando muitos processos bioquímicos.

Todos eucariotos superiores, fungos e a maioria dos protozoários sintetizam poliaminas “de novo” a partir de dois aminoácidos precursores: L-ornitina e L-metionina. A putrescina (1,4-diaminobutano) é sintetizada enzimaticamente a partir da L-ornitina pela ornitina descarboxilase (ODC) (BASSELIN et al, 2000).

Neste contexto, aparece o antimetabólito 2'-difluorometilornitina (DFMO), um inibidor irreversível da ODC e primeiro composto antitripanomissida incluído na farmacopéia.

A grande diferença entre a ODC humana e de parasitos como *T. brucei* e *L. donovani* esta associada a meia vida, que enquanto na enzima do hospedeiro é de menos de 30 minutos, no parasito ultrapassa 6 horas. A longa meia vida da ODC no parasito, por sua vez parece ser o requisito para sensibilidade ao DFMO (REGUERA et al, 2005).

Análogos destas poliaminas, são fortes inibidores competitivos, sendo que o Bis(benzil)poliamina demonstrou inibir a absorção de espermidina e putrescina em vermes filariais (REGUERA et al, 2005).

Outras enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas são também alvos moleculares promissores para o planejamento de novos fármacos leishmanicidas.

Entre estas destaca-se a *S-adenosilmetionina descarboxilase* (SAMDC) e *Espermidina sintase* envolvidas na biossíntese da espermidina e *Espermina sintetase*, envolvida na biossíntese da espermina (REGUERA et al, 2005).

Proteína quinases

A importância da proteína quinase na sinalização celular e controle do ciclo celular, tem sido detalhada estrutural e funcionalmente em vários eucariotos. E levou a busca por inibidores químicos específicos para controle de várias doenças (DOERIG et al, 2002).

Câncer, doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer são alguns exemplos de patologias que podem envolver este vasto grupo de enzimas.

Recentemente, a Novartis e a Astra-Zeneca lançaram dois antineoplásicos inibidores da *Tirosina quinase*, o Gleevec® e o Iressa®. Enquanto, o Gleevec® (Novartis) tem como alvo o sítio codificado como BCR-ABL e é empregado no tratamento da leucemia mielóide, o Iressa® da Astra-Zeneca, interage em sítios desta enzima no receptor do fator de crescimento epidérmico, e é indicado para tratamento de tumores do trato gastrointestinal (NAULA et al, 2005).

Considerando, a importância destas enzimas no complexo ciclo vital da *Leishmania*, e outros protozoários da família tripanossomatídea, bem como as diferenças estruturais entre quinases humanas e dos parasitos da ordem de 60% ou mais, justifica-se a potencialidade deste alvo molecular (NAULA et al, 2005).

O kinoma (genoma específico para quinases) das Tripanossomatídeos é cerca de 1/3 do humano, diferindo deste em vários aspectos. Via de regra um alvo molecular potencial para quimioterápico deve diferir em mais de 60% do homólogo do hospedeiro (NAULA et al, 2005).

Por apresentarem-se freqüentemente, desreguladas em células tumorais, as quinases ciclina-dependentes (CDKs) vem sendo investigadas intensivamente. O flavopiridol, foi o primeiro inibidor de CDKs a entrar na triagem clínica em quimioterapia do câncer. O mesmo principio pode ser aplicado a parasitos, já que CDKs tem importância crucial no crescimento e divisão celular. A função de duas CDKs foi analisada em espécies de *Leishmania* em formas promastigotas em estágio proliferativo e metacíclico, confirmando-se essencial (NAULA et al, 2005).

Já as mitogen-ativado proteína quinases (MAPKs) são importantes na diferenciação e proliferação celular em muitos eucariotos e vem sendo investigados como alvos igualmente promissores. Como exemplo da importância das MAPKs, destaca-se seu papel na manutenção e formação de flagelos nestes parasitos (BARRETT et al, 1999; NAULA et al, 2005).

Outras quinases de valor como alvos moleculares para leishmanicidas incluem as quinases da família das *caseína quinases*, *piruvato fosfato diquinase*, *adenosina quinase* e outras *quinases* (BARRETT et al, 1999).

Glioxilases

Todos organismos vivos dispõe de enzimas destoxicantes, tais como as enzimas antioxidantes e enzimas que metabolizam toxinas ou xenobióticos.

O sistema glioxilase é responsável por proteger a célula de danos causados pelo metilglioxal, um subproduto da glicólise de caráter citotóxico e mutagênico. Este sistema é composto pela *Glioxilase I*, que catalisa a formação do S-D-lactoil glutationa a partir do hemitioacetal formado não enzimaticamente de metilglioxal e glutationa e *Glioxilase II* que converte S-D-lactoil glutationa em lactato e glutationa livre.

O sistema glioxilase do parasito difere em vários aspectos do humano, apresentando apenas 30% de identidade. Entre as diferenças pontuais, destaca-se o fato de que ao invés de glutationa como substrato e zinco como co-fator, a glioxilase I do protozoário utiliza como substrato a tripanotona e apresenta como co-fator o níquel (PADMANABHAN et al, 2005). Tais aspectos, têm apontado o sistema glioxilase como alvo potencial para desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas.

Cisteína Proteinases

Cisteína proteinases, é uma enzima vital no ciclo de vida do parasito, entre outras funções participa na nutrição, invasão do hospedeiro e mecanismos de defesa contra sistema imunológico (BARRETT et al, 1999; MOTTRAM et al, 2004).

Recentemente, foi constatado que estas proteinases são fortemente inibidas pelo óxido nítrico (NO). Neste contexto, compostos doadores de NO (ex. trinitrato de glicerila, nitroprussiato de sódio, S-nitrosoglutatina) vem sendo propostos como alternativa terapêutica ao tratamento de protozooses causadas por Tripanossomatídeos (SALVATI et al, 2001).

Outros Sistemas Enzimáticos

Outros sistemas enzimáticos investigados como alvos potenciais para ação de fármacos leishmanicidas incluem: dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) envolvido no metabolismo do folato; tripanotona redutase, envolvido no metabolismo do tiol, óxido nítrico sintase, triose fosfato isomerase, envolvida na glicólise, fosfatidilinositol, fosfolipase C, 14-demetilase, estero 24-metiltransferase e esqualeno 2,3-epoxidase envolvidas no metabolismo de lipídios e esteróides (LORENTE et al, 2005; BARRETT et al, 1999; GENESTRA et al, 2006; ARREBOLA et al, 1996).

Outros Alvos – enzimas do metabolismo intermediário

Glicossomas

Em Tripanossomatídeos (*Trypanosoma* e *Leishmania*), o metabolismo parcial de carboidratos, incluindo glicólise é compartimentalizado em organelas específicas chamadas glicossomas. A biogênese destas organelas e correta compartimentalização de enzimas glicolíticas é essencial para estes parasitos. A biogênese ocorre via processos que envolvem proteínas chamadas peroxinas. As peroxinas, por sua vez apresentam baixo nível de identidade com a humana, constituindo-se em alvo molecular potencial (BARRETT et al, 1999; MOYERSON et al, 2004).

Heme

O grupo prostético heme é de importância vital, pois está envolvido em vários processos metabólicos e no transporte de elétrons. Porém, como a maioria dos Tripanossomatídeos, a *Leishmania* requer o grupo heme ou porfirinas pré formada para seu desenvolvimento, porque carece de várias enzimas chaves da rota biosintética desta macromolécula.

Assim sendo o parasito depende do suprimento de grupos heme da célula hospedeira para sua sobrevivência, presumivelmente via catabolismo e seqüestro de hemoproteínas do macrófago. Neste contexto, drogas capazes de interferir em processos de aquisição do grupo heme ou de porfirinas pré-formadas teria aplicação potencial no tratamento da leishmaníase (KELLY et al, 2003).

Recentemente, uma nova classe de agentes antimalariais análogos às xantonas demonstrou alta afinidade de ligação em sítios relacionados ao grupo heme, bloqueando habilidade do parasito de acessar este grupo prostético. A

otimização destas xantonas levou ao composto 3,6-bis-?-N,N-dietilaminoxixantona, cujo IC₅₀ foi de 8,0 +/-0,8 ? M (KELLY et al, 2003).

Tubulina

A diferença entre tubulina de parasitos e mamíferos pode ser expressa em percentagem de aproximadamente 18%, apontando esta proteína bastante abundante em *Leishmania* e que tem importante papel na regulação da nucleação de microtúbulos e funcionamento dos flagelos como um possível alvo molecular (LIBUSOVÁ et al, 2004; ARMSON et al, 1999).

COMPOSTOS EM ESTUDO

A demanda por novos fármacos leishmanicidas tem se intensificado com aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como a fármacos de segunda geração. Outrossim, o número de quimioterápicos disponíveis principalmente, para tratamento de doenças crônicas está muito abaixo do satisfatório (VOULDOUKIS et al, 2006).

Neste contexto, vários compostos foram relatados, porém nenhum dos compostos testados ou mesmos em uso apresentam eficácia e segurança adequadas (RAYCHAUDHURY et al, 2005; FRANCK et al, 2004).

Complexos Metálicos e Organometálicos

A combinação entre estrutura metálica e resíduos orgânicos, em especial de fármacos quimioterápicos é uma das estratégias utilizadas na busca de novos agentes antiparasitários. Uma vez que em geral, resulta em compostos menos tóxicos e mais ativos (MBONGO et al, 1997; LOUISEAU et al, 1992).

Vários complexos organometálicos tem sido sintetizados por associação com moléculas ativas e elementos metálicos como Pt, Rh, Ir, Pd e Os. A atividade tripanocida foi estudada *in vitro* e *in vivo* contra *T. brucei*. O composto mais ativo foram os derivados com pentamidina, destacando-se complexo Ir-COD⁶-pentamidina, um complexo catiônico organometálico de Iridio(I), que apresentou atividade *in vitro* 16 vezes superior a pentamidina e eficácia em concentrações de 60 µg/L (LOUISEAU et al, 1992).

Avaliação da atividade biológica contra *L. donovani*, de uma série de 15 compostos organometálicos de ródio ou irídio, mostrou que a natureza dos sais e

⁶ COD = 1,5-ciclooctadieno

respectiva facilidade de transporte através da membrana foi o parâmetro principal para citotoxicidade. A estabilidade para todos complexos, bem como um aumento de 50% na potência foi observado para dois compostos de Ir(I) e dois de Rh(I) (MBONGO et al, 1997).

O complexo de fórmula geral $[\text{Ir}_2^{\text{I}}-(\text{COT}^7)_2\text{-pentamidina}]$ foi avaliado em estudo comparativo com anfotericina B, pentamidina e paromicina, mostrando-se eficácia e segurança superior (MBONGO et al, 1997).

Com base na premissa de que muitos antiparasitários agem por ligação ao DNA, as propriedades citotóxicas de compostos catiônicos de *trans*-Pt(II)Cl₂ com grupos inertes distintos foram investigadas contra formas promastigotas do parasito *Leishmania infantum*. Os compostos contendo como grupos inertes: a) *n*-butilamina e piperazina e b) amônia e 4-piperidino-piperidina apresentaram citotoxicidade respectivamente 2,5 e 1,6 vezes maior que o controle positivo (cisplatina) contra formas amastigotas da *Leishmania infantum* (NGUEWA et al, 2005).

O complexo organometálico de trifenil estanho, Trifenil Estanho Salicilanilida Tiosemicarbazona $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{OSal.TSCZH})]$ (TTST) apresentou excelente atividade contra *L. donovani*. Enquanto, para gluconato de Sb(V), controle positivo, a eficácia foi de 65% após aplicação de doses de 20 mg/Kg, o TTST reduziu a infecção em 87% mediante doses de 10 mg/kg, apresentando um IC₅₀ de 0,05 ± 0,01 mg/mL (RAYCHAUDHURY et al, 2005). Esta habilidade de matar parasitos intracelulares (amastigota) de forma mais eficiente e em baixas concentrações quando comparado a antimoniais, faz deste composto um candidato potencial ao precário arsenal terapêutico existente.

O papel do ferro bem como a formação de radicais livres ao mecanismo de ação de compostos metalóides tem sido demonstrado em vários experimentos sob variadas concentrações deste metal e de antioxidantes de baixo peso molecular. Nestes estudos, comprovou-se que na ausência do ferro, a eficácia de arsenicais e antimoniais era drasticamente reduzida (MEHTA & SHAHA, 2006).

Derivados Quinolínicos

Vários derivados de origem vegetal ou sintética, contendo anéis quinolínicos em sua estrutura apresentaram atividade leishmanicida (FRANCK et al, 2004)

⁷COT = 1,5-ciclooctatetraeno

Análogos de 8-quinolinaminas (ex. primaquina), vem sendo testados contra vários protozoários relacionados a doenças tropicais de grande impacto em saúde pública tais como: *Plasmodium sp* (Malária), *Trypanossoma cruzi* (Chagas) e *Leishmania donovani* (Calazar) (JAIN et al, 2005).

Quinonas, como atovaquona, parvaquona e menoctona, apresentaram atividade antimalarial, levando também a um extensivo estudo de outros derivados contra estas graves protozooses (CAUCHETIER et al, 2000).

Os antibióticos fluoroquinolônicos atuam em enzimas DNA girase e topoisomerasas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Por outro lado, *Leishmania donovani* assim como bactérias, apresenta topoisomerasase tipo I, que requer a presença de cátions positivos para desenrolar sua estrutura de super hélice (MBONGO et al, 1997).

Um grande número de derivados 8-hidroxiquinolínicos têm sido sintetizado e avaliado por suas propriedades antitumoral e antimicrobial (DARDARI et al, 2004). Um novo derivado, o 7-[5'-(3'-fenilisoazolino)metil]-8-hidroxiquinolina, foi avaliado por sua ação leishmanicida, apresentando em ensaios *in vitro*, atividade em concentrações micromolares contra várias espécies de *Leishmania sp*. Quando comparado ao controle positivo (anfotericina B), resultados promissores (DARDARI et al, 2004).

A marfloxacina é uma fluoroquinolona de terceira geração, que se mostrou mais efetiva que os antimoniais comerciais, *N*-metil-glumina (Glucantime®) e estibogluconato (Pentostan®), mesmo em concentrações de 500 µg/mL, onde a toxicidade é mínima (VOULDOUKIS et al, 2006).

Derivados Imidazólicos

Da constatação preliminar da atividade leishmanicida do cetoconazol em estudos *in vitro*, vários compostos imidazólicos passaram a ser investigados (ARMSON et al, 1999; FOROUNMADI et al, 2005).

Os derivados imidazólicos, assim como a anfotericina B, interferem na síntese do ergosterol, um importante componente de membrana (DOGRA & SAXENA, 1996).

Em particular para o derivado imidazólico, benzimidazol, foi proposto como mecanismo de ação a ligação em resíduos fenilalanina e glutamato de subunidades α e β -tubulina. A importância de aspectos de Relação Estrutura química e Atividade

biológica (REA) é evidenciada pelas diferenças observadas tanto no que diz respeito a sensibilidade diferenciadas em dois aspectos:

a) Diferentes espécies de parasitos, cujas características estruturais do receptor diferem sensivelmente, apresentam IC_{50} que varia de 0,7 a 1,7 μ M para o benzimidazol. Estudos paralelos envolvendo derivados de dinitroanilinas demonstraram que formas amastigotas são cerca de 20 vezes mais sensíveis que formas promastigotas.

b) O análogo albendazol foi inativo mesmo em concentrações superiores a 80 μ M. Estudos envolvendo derivados de dinitroanilinas também mostraram diferenças de atividade bastante significativas, tendo sido o IC_{50} de 0,8 μ M para cloroanilina e de 19 μ M para trifluoroanilina (ARMSON et al, 1999).

O itraconazol, imidazólico que se destaca por sua excelente biodisponibilidade oral, foi avaliado em estudos de duplo cego. Os resultados sugerem o uso deste composto como primeira escolha em terapias iniciais para tratamento da leishmaníase cutânea (AMATO et al, 2000; ARMSON et al, 1999).

Outra série de imidazólicos testadas, foi a série de tiadiazóis (Fig. 4), nesta série o derivado substituído com anel piperazínico foi o mais ativo com valor de IC_{50} de 0,19 μ M. Valor este, que expressa uma eficácia muito superior ao controle positivo (Pentosta®), já que o IC_{50} foi de 243 μ M (FOROUMADI et al, 2005).

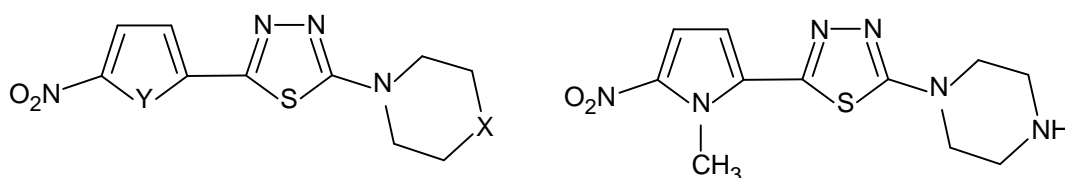


Fig. 4 – Estrutura geral e composto mais ativo da série dos tiadiazóis.

Quimioterápicos Diversos: alternativas e perspectivas

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídico, também chamado aminosidina, foi testado no tratamento de leishmaníase visceral apresentando baixa toxicidade. Entretanto, dada a nefrotoxicidade e ototoxicidade, este fármaco também injetável, pode ter seu emprego limitado no caso de comprometimento das funções renais (POLI et al, 1997).

No que diz respeito a eficácia, o regime terapêutico com aminosidina, se mostrou melhor que o controle positivo (stibogluconato®) com significativo aumento

da taxa de cura após 30 dias de tratamento. Mostrando-se como alternativa promissora no caso de desenvolvimento de resistência a compostos antimoniais (AMATO et al, 2000; POLI et al, 1997).

Análogos da pentamidina, como diaminazeno, diaminazeno-di-aceturato (Trypan®) (MACHARIA et al, 2004), bem como diaminas alifáticas e aminoalcoóis (DEL-OLMO et al, 2002) também vem sendo avaliados com bons resultados.

Entre os agentes antineoplásicos investigados com propósito leishmanicida destacam-se o taxol, os antimetabólitos e a miltefosina (KAPOOR et al, 1999; PAPAGIANNAROS et al, 2005; PEYRON et al, 2005).

O antineoplásico taxol apresentou atividade *in vitro* contra *L. donovani* em concentrações da ordem de 30 nM (KAPOOR et al, 1999).

A miltefosina, um antineoplásico alquilfosfolipídico, tem se mostrado eficaz contra leishmaníase visceral. Sendo que, a grande vantagem deste fármaco está na possibilidade de administração via oral. Para este fármaco, os estudos clínicos de Fase III, já vem sendo realizados na Índia, tendo-se relatado excelentes resultados contra *Leishmania donovani* (KAPOOR et al, 1999; PAPAGIANNAROS et al, 2005; PEYRON et al, 2005).

Uma alternativa à redução da toxicidade é o uso de novos sistemas de liberação, tais como lipossomas, nanotecnologia e polímeros carreadores (NAN et al, 2004; COHEN, 1998).

Estudos clínicos de fase II com uma forma lipossomada de anfotericina B (AmBisome®) mostraram que de fato é menos tóxica que a forma injetável convencional, reduzindo consideravelmente sua nefrotoxicidade (RATH et al, 2003).

O uso de sistemas carreadores lipossomais foi aplicado com êxito no sentido de aumentar a eficácia leishmanicida da atovaquona, embora o aumento observado se manteve ainda em níveis inferiores ao de fármacos convencionais (TOURNAIRE et al, 1996).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio desta revisão bibliográfica verifica-se que o arsenal terapêutico disponível para tratamento da leishmaníase, assim como para outras parasitoses tropicais carece de medicamentos mais eficazes. Fato este que se agrava com os mecanismos de resistência aos fármacos em uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO, V.S; PADILHA, A.R.S; NICODEMO, A.C; DUARTE, M.I.S; VALENTINI, M; UIP, D.E; BOULOS, M AND AMATO, V.N, Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, *International Journal of Infectious Diseases*, v. 4(3), p. 153-157, 2000.
- ARAUJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial Activity of Compounds Extracted and Characterizes from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 751-754, 1998.
- ARMSON, A; KAMAU, S.W; GRIMM, F; REYNOLISON, J.A; BEST, W.N; MACDONALD, L.M AND THOMPSON, R.C.A, A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 73, p. 303-311, 1999.
- ARREBOLA, R.; OLMO, A.; CAMACHO, A.; RUIZ-PÉREZ, L.M.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; A mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from *Leishmania major* as a selectable marker in transfection experiments, *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 79 (1), p. 129-133, 1996.
- BARRETT, M.P.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C., Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmaniasis, *Trends in Microbiology*, v. 7(2), p. 82-88, 1999.
- BASSELIN, M.; COOMBS, G.H.; BARRETT, M.P.; Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 109(1), p. 37-46, 2000.
- BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of Chalcone Analogues with Increased Antileishmanial Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BURCHMORE, R.J.S.; BARRETT, M.P., Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes, *International Journal for Parasitology*, v. 31 (12), p. 1311-1320, 2001.
- NAULA, C; PARSONS, M AND MOTTRAM, J.C, 2005. Protein kinases as drug target in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1754, p. 151-159.
- CAUCHETIER, E; PAUL, M; RIVOLLET, D; FESSI, H; ASTIER, A AND DENIAU, M, Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. *International Journal for Parasitology* 30, p. 777-783, 2000.
- CHAI, Y; YAN, S; WONG, I.L.K; CHOW, L.M.C AND SUN, H, Complexation of antimony (Sbv) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-D-mannose: Formation of both mono- and bis-adducts. *Journal of inorganic Biochemistry* 99, p. 2257-2263, 2005.
- COHEN, B.E, Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels, *International Journal of Pharmaceutics* 162, p. 95-106, 1998.

DARDARI, Z; LEMRANI, M; BAHLOUL, A; SEBBAN, A; HASSAR, M; KITANE, S; BERRADA, M AND BOUDOUMA, M, Antileishmanial activity of a new 8 - hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. II. *Farmaco*, v. 59, p.195-199, 2004.

DEL OLMO, E.; ALVES, M.; LÓPEZ, J.L.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G.; DE ARIAS, A.R.; SAN FEL ICIANO, A., Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-Alcohols, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12(4), p. 659-662, 2002.

DEMICHELI, C; FRÉZARD, F; LECOUCVEY, M AND GARNIER-SUILLEROT, A, Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1570, p. 192-198, 2002.

DOERIG, C; MEIJER, L AND MOTTRAM, J.C, Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends in Parasitology*, v.18(8), p. 366-71, 2002.

DOGRA, J. & SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomized double - blind trial in cutaneous disease. *International Journal of Parasitology*, v. 26, n. 12, p. 1413-1315, 1996.

DZAMITIKA, S.A.; FALCÃO, C.A.B.; DE OLIVEIRA, F.B.; MARBEUF, C.; GARNIER-SUILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FRÉZARD, F., Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance, *Chemico-Biological Interactions*, v. 160(3), p. 217-224, 2006.

FOROUMADI, A.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SOLTANI, F. ; ASGHARIAN-REZAEI, M.; DABIRI, S.; KHARAZMI, S.; SHAFIEE, A., Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2-(5-nitro-2-furyl) and 2-(5-nitro-2-thienyl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15 (8), p. 1983-1985, 2005.

FOROUMADI, A; EMAMI, S; POURNOURMOHAMMADI, A; SHAFICE, A, Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2- (1- methyl- 5- nitro- 1 H- imidazol- 2- yl)- 5- substituted- 1, 3, 4- thiadiazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 1346-1350, 2005.

FRANCK, X; FOURNET, A; PRINA, E; MAHIEUX, R; HOCQUEMILLER, R.; BRUNO, F, Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters* v. 14, p. 3635-3638, 2004.

GENESTRA, M.; GUEDES-SILVA, D.; SOUZA, W. J.S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SOARES-BEZERRA, R.J.; MONTEIRO, F.P.; LEON, L.L., Nitric Oxide Synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes, *Archives of Medical Research*, v. 37 (3), p. 328-333, 2006.

GONZÁLEZ, P.; MARÍN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; HITOS, A. B.; ROSALES, M. J.; REINA, M.; DÍAZ, J. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro Activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents* v. 25 , p. 136-141, 2005.

GRANDIC, S. R.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. In vitro Antileishmanial Activity of Acetogenins from Annonaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p. 388-392, 2004.

JAIN, M; KHAN, S.I; TEKWANI, B.L; JACOB, M.R; SINGH, S; SINGH, P.P AND JAIN, R, Synthesis, antimalarial, antileishmanial, and antimicrobial activities of some 8-quinolinamine analogues. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 4458-4466, 2005.

KAPOOR, P.; GHOSH, A.; MADHUBALA, R., Isolation of a taxol-resistant *Leishmania donovani* promastigote mutant that exhibits a multidrug-resistant phenotype, *FEMS Microbiology Letters*, v. 176(2), p. 437-441, 1999.

KAPOOR, P.; SACHDEVA, M.; MADHUBALA, R., Effect of the microtubule stabilising agent taxol on leishmanial protozoan parasites in vitro, *FEMS Microbiology Letters*, v. 176(2), p. 429-435, 1999.

KAYSER, O; OLBRICH, C; YARDLEY, V; KIDERLEN, A.F AND CROFT, S.L, Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* 254, p. 73-75, 2003.

KELLY, J.X.; IGNATUSHCHENKO, M.V.; BOUWER, H.G.; PEYTON, D.H.; HINRICHS, D.J.; WINTER, R.W.; RISCOE, M., Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.126(1), p. 43-49, 2003.

KRAMP, K.L; DEWITT, K; FLORA, J.W; MUDDIMAN, D.C; SLUNT, K.M.; HOUSTON, T.A., Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 695-698, 2005.

LEANDRO, C.; CAMPINO, L., Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance,. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, p.352 -357, 2003.

LIBUSOVÁ, L.; SULIMENKO, T.; SULIMENKO, V.; HOZÁK, P.; DRÁBER, P., ?-Tubulin in *Leishmania*: cell cycle-dependent changes in subcellular localization and heterogeneity of its isoforms, *Experimental Cell Research*, v. 295 (2), p.375-86, 2004.

[LOISEAU](#), P.M., CRACIUNESCU, D.G., DOADRIO -VILLAREJO, J.C., CERTAD -FOMBONA, G. AND GAYRAL, P., Pharmacomodulations on new organometallic complexes of Ir, Pt, Rh, Pd, Os: in vitro and in vivo trypanocidal study against *Trypanosoma brucei brucei*. *Trop. Med. Parasitol.* v. 43, p. 110–114, 1992.

LORENTE, S.O.; JIMENEZ, C.J .; GROS, L.; YARDLEY, V.; DE LUCA-FRADLEY, K.; CROFT, S.L.; UR BINA, J.A.; RUIZ-PEREZ, L.M.; PACANOWSKA, D.G.; GILBERT, I.H., Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13(18), p. 5435-5453, 2005.

MACHARIA, J.C.; BOURDICHON, A.J.; GICHERU, M.M., Efficacy of trypan®: a diminazene based drug as antileishmanial agent , *Acta Tropica*, v. 92(3), p. 267-272, 2004.

MACHUCA, C; RODRIGUEZ, A; HERRERA, M; SILVA, S; PONTE -SUCRE, A; *Leishmania amazonensis*: Metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker. *Experimental Parasitology*, disponível *online*, 2006.

[MBONGO](#), N., LOISEAU, P.M., LAWRENCE, F., BORRIES, C., CRACIUNESCU, D.G. AND ROBERT-GERO, M., In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine, *Parasitol. Res.* 83, pp. 515–517, 1997.

[MBONGO](#), N., LOISEAU, P.M., LAWRENCE, F., BORIES, C., CRACIUNESCU, D.G. AND ROBERT-GERO, M., In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. *Parasitol. Res.* V. 83, p. 515–517, 1997.

MEHTA, A.; SHAHA, C., Mechanism of metalloinduced death in *Leishmania* spp.: Role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione, *Free Radical Biology and Medicine*, In Press, Corrected Proof, disponível *online*, 2006.

MENDONÇA-FILHO, R. R.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D. S.; SANTOS, A. L. S.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S.; ROSA, M. S. S. Leishmanicidal activity of Polyphenolic-rich Extract from Husk Fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, p. 136-143, 2004.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A. K. Protective Effect of Picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* Infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sciences*, v. 63, n. 20, p. 1823-1834, 1998.

MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; ALEXANDER, J., Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*, *Current Opinion in Microbiology*, v. 7 (4), p. 375-381, 2004.

MOYERSON, J.; CHOE, J.; FAN, E.; HOL, W.J.M.G.J; MICHELS, P.A.M., Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target, *FEMS Microbiology Reviews*, v.28(5), p. 603-643, 2004.

MUKHERJEE, A; PADMANABHAN, P.K; SAHAMI, M.H; BARRETT, M.P AND MADHUBALA, R, Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular e Biochemical Parasitology* v. 145, p. 1-10, 2006.

NAN, A.; CROFT, S.L.; YARDLEY, V.; GHANDEHARI, H., Targetable water-soluble polymer-drug conjugates for the treatment of visceral leishmaniasis, *Journal of Controlled Release*, v. 94(1), p. 115-127, 2004.

NGUEWA, P.A; FUERTES, M.A; IBORA, S; NAJAJREH, Y; GIBSON, D; MATINEZ, E; ALONSO, C AND PÉREZ, J. M, Water soluble cationic *trans*- platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania infantum*. *Journal of Biochemistry* 99, p. 727-736, 2005.

OUELLETTE, M; LÉGARÉ, D; HAIMEUR, A; GRONDIN, K; ROY, G; BROCHU, C AND PAPADOPALOU, B, ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance, v. 1, p. 43-48, 1998.

PADMANABHAN, P.K.; MUKHERJEE, A.; SINGH, S.; CHATTOPADHYAYA, S.; GOWRI, V.S.; MYLER, P.J.; SRINIVASAN, N. ; MADHUBALA, R., Glyoxalase I from *Leishmania donovani*: A potential target for anti-parasite drug, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 337(4), p. 1237-1248, 2005.

PAPAGIANNAROS, A., BORIES, C.; DEMETZOS, C.; LOISEAU, P.M., Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59(10), p. 545-550, 2005.

PEYRON, C.; BENHIDA, R.; BORIES, C.; LOISEAU, P.M., Synthesis and in vitro antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives *Bioorganic Chemistry*, v. 33(6), p. 439-447, 2005.

- PLOCK, A.; SOKOLOWSKA-KÖHLER, W.; PRESBER, W. Application of Flow Cytometry and Microscopical Methods to Characterize the Effect of Herbal Drugs on *Leishmania* Spp. *Experimental Parasitology*, V. 97, P. 141 – 153, 2001.
- POLI, A; SOZZI, S; GUIDI, G; BANDINELLI, P AND MANCIANTI, F, Comparison of amebosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 71, p. 263-271, 1997.
- PONTRE-SUCRE, C.Y.; FERNANDEZ, M.; MOLL, H.; MENDOZA-LEON, A., *Leishmania* sp.: Growth and Survival are Impaired by Ion channel Blockers. *Experimental parasitology*, v. 88, p. 11-19, 1998.
- PURI, A.; SAHAI, R.; HAQ, W.; ZAIDI, A.; GURU, P.Y.; TRIPATHI, L.M.; S RIVASTAVA, V.M.L., Immunomodulatory activity of analog of muramyl dipeptide and their use as adjunct to chemotherapy of *Leishmania donovani* in hamster, *International Immunopharmacology*, v. 5 (6), p. 937-946, 2005.
- RATH, S; TRIVELIN, L.A; IMBRUNITO, T.R; TOMAZELA, D.M; JESÚS, M.N AND MARZAL, P.C, Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. *Química nova*, v.26(4), p. 550-555, 2003.
- RAYCHAUDHURY, B; BANERJEE, S; GUPTA, S; SINGH, R.V AND DATTA, S.C, Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*, v. 95, p. 1-8, 2005.
- REGUERA, M. R; TEKWANI, B.L AND BALAÑA -FOUCE, R, Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.140, p. 151-164, 2005.
- ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R.; RICE, D. W.; GINGER, M.; CHANCE, M. L., GOAD, L. J., Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa, *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.126(2), p. 129-142, 2003.
- ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACE DO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A Review of Natural Products with Antileishmanial Activity. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535, 2005.
- SALVATI, L.; MATTU, M.; COLASANTI, M.; SCALONE, A.; VENTURINI, G.; GRADONI, L.; ASCENZI, P., NO donors inhibit *Leishmania infantum* cysteine proteinase activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1545 (1-2), p. 357-366, 2001.
- SERENO, D; HOLZMULLER, P AND LEMESTRE, J. L, Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 74, p. 25-31, 2000.
- TORRES-SANTOS, E. C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R. R.; CARAUTA, J. P.P.; FALCÃO, C. A. B.; KAPLAN, M. A. C.; Rossi-Bergmann, B. Antileishmanial Activity of Isolated Triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, v. 11, p. 114-120, 2004.
- TOURNAIRE, C; CAUJOLLE, R; PAYARD, M; COMMENGES, G; BESSIÈRES, M.H; BORIES, C; LOISEAU, P.M.; GAYRAL, P., Synthesis and protozoocidal activities of quinones. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 31, p. 507-511, 1996.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial Activity of Eugenol-rich Essential Oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, v. 55, p. 99-105, 2006.

UZCATEGUI, N.L.; FIGARELLA, K.; CAMACHO, N.; FONTRE-SUCRE, A., Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide- resistant *Leishmania* parasites. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, v. 140, p. 395-402, 2005.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHLÉ, F., Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology* 135. p. 137-146, 2006.

WILLIAMS, C.; ESPINOSA, O. A.; MONTENEGRO, H.; CUBILLA, L.; CAPSON, T. L.; ORTEGA-BARRÍA, E.; ROMERO, L. I. Hidrosoluble Formazan XTT: its Application to Natural Products discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, p. 813-816, 2003.