

Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos

Rômulo José Soares-Bezerra^{1,2}, Leonor Leon², Marcelo Genestra^{2*}

¹Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, ²Departamento de Imunologia, Fundação Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero Leishmania sp., que se apresentam na forma promastigota ou amastigota; os promastigotas infectam o inseto vetor e os amastigotas são as formas infectivas antes presentes em macrófagos humanos. O tratamento utilizado pela clínica tem se mostrado ineficaz; os fármacos utilizados se apresentam na forma injetável, o que dificulta o tratamento, já que o paciente, para ser tratado, deve ser internado para as aplicações - que são dolorosas - e assim muitos pacientes desistem do tratamento. Outra razão para a internação é a monitoração dos efeitos colaterais causados pelos fármacos. Por estas razões a quimioterapia para leishmaniose tem sido objeto de estudo de muitos laboratórios de pesquisa, os quais têm testado outras substâncias químicas e extratos de plantas com a finalidade de se encontrar novos agentes leishmanicidas com menores efeitos colaterais e ótima biodisponibilidade. Além disso, pesquisam-se, também, outras formas farmacêuticas que viabilizem a aplicação desses fármacos, o que tornaria desnecessária a internação do paciente para se efetuar o tratamento. Este artigo visa discutir os recentes avanços da quimioterapia utilizada para as leishmanioses e, também, apresentar os aspectos farmacológicos e bioquímicos da participação de moléculas intracelulares do parasita como alvos de fármacos.

Unitermos

- Leishmania
- Quimioterapia
- Alvo de fármacos

*Correspondência:

Marcelo Genestra
Departamento de Imunologia/
Laboratório de Bioquímica de
Tripanossomatídeos
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos
21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil
E-mail: genestra@ioc.fiocruz.br

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são protozooses causadas por diferentes espécies do parasita do gênero *Leishmania* e podem ser classificadas em três manifestações principais (Lainson, Shaw, 1987; Glew *et al.*, 1988; Grimaldi, Tesh,

1993): a) **VISCERAL OU CALAZAR**, causada principalmente por *L. donovani*, mas também pode ser causada por *L. infantum* e *L. chagasi*, e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, com aproximadamente 100% de taxa de mortalidade em indivíduos não tratados; b) **MUCOCUTÂNEA**, geral-

mente causada por *L. braziliensis*, compreendendo lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades; c) **CUTÂNEA**, causada geralmente por *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*, sendo caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas (braços, pernas, entre outras). Entretanto, segundo Cupolillo (2000), existem mais de 30 espécies de *Leishmania* que podem ser classificadas de acordo com o local de surgimento da doença. No Brasil, os casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea são ocasionados pelo gênero *L. braziliensis*.

Os parasitas causadores desta protozoose apresentam-se na forma **amastigota**, quando estão infectando o homem, e na forma **promastigota**, quando estão infectando o inseto vetor. A transmissão da doença para o homem ocorre quando o flebotomíneo - fêmea promove seu repasto sanguíneo (enquanto o inseto vetor suga o sangue do hospedeiro vertebrado, ele transfere promastigotas metacíclicas); estas formas tendem a infectar células do sistema fagocítico mononuclear do homem (principalmente macrófagos) e quando se encontram no interior do macrófago, os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam, levando ao rompimento desta célula hospedeira. A lise leva à liberação de grande quantidade de parasitas, que infectam outros macrófagos. A infecção gera lesões, sendo a forma visceral a mais grave e fatal desta protozoose (Magill, 1995).

A epidemiologia das leishmanioses é bastante considerável, tendo em vista o registro de aproximadamente dois milhões de novos casos por ano no mundo. Deste total, 1,5 milhões são da forma cutânea e da visceral, 0,5 milhão (WHO/1999). Existem estudos clínicos na Europa, que demonstram co-infecção por parasitos do gênero *Leishmania* e pelo HIV (Davidson, 1998); há também os que relatam condições de predisposição à doença, como no caso de pacientes portadores de câncer, em transplantados ou com doenças auto-imunes (Guarino *et al.*, 1994; Moroni *et al.*, 1995).

QUIMIOTERAPIA

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peri-domiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com diversos fármacos disponíveis no mercado mundial. Entretanto, tais fármacos apresentam série de problemas, como resistência do parasita (Ullman *et al.*, 1989; Grögl *et al.*, 1992; Lira *et al.*, 1999) e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principal-

mente, a eficácia deles. Além disso, todos os fármacos disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente. Infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes (Amato, 1998).

Para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessária prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo*. Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Entre estes incluem: a) **Inibidores do metabolismo de folatos** (Beck, Ullman, 1991): a via dos folatos tem como alvo principal a enzima diidrofolato redutase (DHFR), que faz a redução do ácido diidrofolico a ácido tetraidrofolico, usando NADPH com cofator. Embora esta via não seja bem definida em tripanossomatídeos, é uma das mais estudadas na atualidade, em que muitos pesquisadores trabalham em busca de compostos que atuem inibindo a (DHFR) com eficácia, prejudicando, assim, este metabolismo; b) **Inibidores da síntese de poliaminas**: as poliaminas atuam regulando o crescimento e diferenciação celular. Na síntese destas, encontra-se a ação de duas enzimas de fundamental importância, que são a ornitina descarboxilase e a S-adenosil-L-metionina descarboxilase (Brum *et al.*, 1996). As poliaminas servem de substrato para a tripanotona redutase (TR) na síntese da tripanotona (T). Os tripanossomatídeos utilizam a via T/TR para realizar o balanço redox (Fairlamb, Cerami, 1985). Nos mamíferos este balanço é realizado via glutatona/glutatona redutase, sendo equivalente ao sistema T/TR nos tripanossomatídeos. Esta diferença é alvo de estudo de novos fármacos inibidores desta via metabólica (Krauth-Siegel, Scroneck, 1995; Gomes-Cardoso *et al.*, 1998; Castro-Pinto, 2002); c) **Inibidores da síntese de tubulinas**: inibidores de microtúbulos são comercializados desde de 1960, sendo a trifluralina e seus análogos exemplos que têm apresentado resultados satisfatórios na inibição da síntese de tubulinas em tripanossomatídeos (Callahan *et al.*, 1996; Werbovetz *et al.*, 1999); d) **Inibidores da biossíntese de esteróides** (Gaughan *et al.*, 1995; Beach *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997): os parasitas do gênero *Leishmania* sintetizam esteróides específicos e indispensáveis para o crescimento e viabilidade celular, os quais são do tipo ergostanos (ergosterol). Existem algumas enzimas indispensáveis à síntese dos ergostanos, que podem ser inibidas ou reguladas por fármacos, como os compostos azólicos (cetoconazol e itraconazol). Entretanto, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende do tipo de *Leishmania*. Novos fármacos como a lovastatina e as alilaminas (terbinafina) também

promovem alterações no metabolismo dos esteróides. f) **Inibidores de DNA topoisomerases** (Chakraborty, Majumder, 1987; Verbovetz *et al.*, 1992; Mauel *et al.*, 1993, Slunt *et al.*, 1996): O DNA do cinetoplasto dos tripanossomatídeos tem gerado interesse no meio científico como um alvo quimioterápico; a DNA topoisomerase II, recentemente isolada de *L. donovani*, é uma enzima que está envolvida no relaxamento da rede do DNA do cinetoplasto e, possivelmente, na replicação. Os inibidores das topoisomerases II (como as 9-anilinoacridinas, as quais são relacionadas aos compostos leishmanicidas como o cloridrato de mepacrina e a clorpromazina na dose de 7,5 mg/mL), demonstraram atividade contra parasitas (amastigotas e promastigotas) de *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. major*. Entretanto, para se ter ação leishmanicida contra *L. donovani*, a dose administrada do fármaco teve que ser maior; g) **Complexos organometálicos**: entre eles encontram-se os inibidores da síntese de DNA e RNA (Castilla *et al.*, 1996; Mesa-Valle *et al.*, 1997): O metabolismo das leishmanias apresenta grande similaridade com alguns tipos celulares tumorais e, deste modo, alguns agentes antitumorais têm sido testados como leishmanicidas; como exemplo os complexos associados a metais. Destes, os que têm demonstrado maior atividade são a *cis*-Pt-oxaminiquina-C12, *cis*-Pt(II)-(2,3,4,5,6,-pentafluoroanilina)2-Br₂, *cis*-Pt-guanetidina-c12 e *cis*-Pt-pentamidina-12, sendo mais ativas em testes *in vitro* contra *L. donovani*. Porém os ensaios *in vivo* demonstram a diminuição do parasitismo em ratos *Wistar* tratados com *cis*-Pt-guanetidina-c12, na dose de 1 g/kg durante quatro dias; h) **Inibidores da via do óxido nítrico** (Fonseca-Geigel, 2000, 2003; Genestra *et al.*, 2001, 2003a,b,c): dentre as vias potenciais estudadas para a ação de fármacos leishmanicidas, existe a via do óxido nítrico. Com a verificação da produção de óxido nítrico por *L. amazonensis*, testes vêm sendo realizados à procura de fármacos, que atuem inibindo essa produção. Os dados indicam a existência de verdadeiro *cross-talk* envolvendo a óxido nítrico sintase (NOS) para que o parasita se proteja do ambiente inóspito do macrófago (Genestra *et al.*, 2003a,d).

ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de Leishmanioses têm sido até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺). Foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (antimônio trivalente – Sb³⁺), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos

evoluíam para o óbito por não haver tratamento (Lainson, 1996). No entanto, esta formulação apresentava toxicidade, ocasionando tosse, dor no peito e depressão. Além disso, era de difícil administração. Em 1937, Smith introduziu a utilização do estibogluconato de sódio (Pentostan[®], um medicamento derivado do ácido estibônico, em que o antimônio está na forma pentavalente, Sb⁵⁺). Desta forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e da toxicidade em relação tártaro emético. O ácido estibônico complexado a carboidratos (duas moléculas de ácido glicônico) é usado para o tratamento das leishmanioses em países de língua inglesa. Em países de língua francesa, espanhola e no Brasil, o fármaco utilizado é o antimoniato de meglumina, também um antimonial pentavalente (Glucantime[®]) (Berman, 1988). A estrutura do Glucantime[®] manteve-se pouco conhecida durante muitos anos, mas, recentemente, Roberts *et al.* (1998) demonstraram que as moléculas de *N*-metil-D-glucamina estão coordenadas com um único átomo de antimônio. A OMS preconiza como tratamento para a leishmaniose visceral 20 mg de Sb/kg/dia, por via intramuscular ou intravenosa, por, no mínimo, 20 dias e até duas semanas após a cura parasitológica, com dose diária máxima de 850 mg de antimônio. Para a leishmaniose cutânea, a recomendação é de 10 a 20 mg Sb/kg/dia, até que a lesão se cure. Para a leishmaniose mucocutânea, é recomendada a administração de 20 mg de Sb/kg/dia durante 30 dias (Tracy, Webster Júnior, 1996).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes continua pouco compreendido, mas parece ser um evento que envolve diversos aspectos do metabolismo do parasita. Tem sido sugerido que algumas particularidades químicas na composição destes fármacos podem contribuir para seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico (presente no Pentostan[®] ou no Glucantime[®]), são capazes de formar complexos solúveis em água com o átomo de antimônio, o que pode distribuir os agentes antimoniais para os macrófagos infectados (Roberts *et al.*, 1995; Sereno *et al.*, 1998).

Além disso, como a forma pentavalente apresenta pouca toxicidade, é possível que esta forma seja um pró-fármaco, que se converte na forma mais tóxica, trivalente, próxima de seu local de ação, ou seja, no interior dos macrófagos ou próximo destas células. Esta conversão foi sugerida há mais de 50 anos (Goodwin, Page, 1943) e tem sido corroborada pela evidência em soro de pacientes tratados com Glucantime[®], que apresenta 15 a 25% de compostos com antimônio trivalente (Sereno *et al.*, 1998). Sereno *et al.* (2001) demonstraram que compostos de antimônio trivalente são extremamente ativos para

promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a forma pentavalente é menos ativa. Os antimoniais pentavalentes (ou a forma ativa, trivalente) parecem interferir na produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise como a β -oxidação de ácidos graxos (Tracy, Webster Júnior, 1996).

Além destes mecanismos, Chakraborty e Majunder (1988) demonstraram que o agente ativo do Pentostan® é capaz de inibir a enzima topoisomerase II purificada de *L. donovani*. A demonstração por Lucumi *et al.* (1998) de que o tratamento de promastigotas de *L. panamensis* com antimoniais, pentavalentes é capaz de estabilizar complexos DNA-proteína está de acordo com a inibição da topoisomerase I. Também, foi demonstrado que antimoniais pentavalentes inibem a enzima fosfofrutoquinase, envolvida na síntese de nucleotídeos trifosfatados (Berman *et al.*, 1985).

Em geral, os antimoniais pentavalentes são bem tolerados, mas algumas reações colaterais podem ocorrer, como dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite (Gasser *et al.*, 1994). Elevação das transaminases hepáticas também foi observada, mas de maneira reversível, cessando com o fim do tratamento (Tracy, Webster Júnior, 1996).

As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento (aplicações diárias durante aproximadamente 20 dias), paralelamente aos efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para este fármaco. Uma tentativa é o encapsulamento dos antimoniais em lipossomas; isto permitiria a redução de efeitos colaterais, dirigindo o fármaco para os sítios de ação, além de poder controlar a concentração e a velocidade de liberação do fármaco no órgão-alvo (Tracy, Webster Júnior, 1996). Além disso, Banduwardene *et al.* (1997) descreveram diferenças na resposta imune de camundongos tratados com o agente ativo do Pentostan® livre e encapsulado, mostrando que na forma encapsulada havia resposta Th1 mais exacerbada do que na forma livre, o que geraria a maior eficiência no tratamento com este fármaco.

AMIDINAS

As amidinas são compostos orgânicos caracterizados pela presença dos grupamentos C=N e C-N, que proporcionam propriedades específicas das funções azometina e amina, respectivamente. Esses compostos se mostram interessantes, principalmente por apresentarem atividade biológica variada. Os derivados aromáticos destes compostos são os mais intensamente estudados. Dentre estes derivados, a pentamidina e o Berenil® (agentes

terapêuticos antitripanossomas africanos) são os compostos mais representativos. Tais diamidinas aromáticas, especialmente a pentamidina, apresentam atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (Berman, 1988).

Basselin *et al.* (1996) descreveram que a pentamidina, utilizada na clínica contra casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais pentavalentes, apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos. Diversos cloridratos da classe das difenilbenzamidas com substituintes metoxi na posição *orto* e *para* dos anéis aromáticos ligados diretamente ao nitrogênio da função amidina apresentam atividade anestésica local e a benzamidina cloro-*para*-substituída apresenta atividade antitumoral contra sarcoma e contra o HIV (Echevarria *et al.*, 1996). Os trabalhos de Canto-Cavalheiro *et al.* (1997, 1999) demonstraram o efeito antitripanossomatídeos de diversos compostos da classe das *N,N'*-difenilbenzamidas, em testes realizados contra epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Tais derivados apresentaram baixa atividade anti-*T. cruzi* para as duas formas estudadas, mas em relação à atividade anti-*Leishmania*, alguns dos compostos substituídos, apesar de mostrarem variação quanto à atividade para ambas as formas evolutivas de *L. amazonensis*, se apresentaram altamente eficazes, em especial os compostos bromado e metoxilado. Posteriormente, Temporal *et al.* (2002) descreveram que a metoxiamidina não é tóxica para a célula hospedeira e a concentração equivalente ao seu valor CE₅₀ impede a interiorização de *L. amazonensis*.

As diamidinas aromáticas são usadas para o tratamento das leishmanioses desde 1939 e são tóxicas para diversos protozoários (Berman, 1988). Estes fármacos são muito usados na clínica em casos não responsivos aos antimoniais pentavalentes e também por apresentarem menos efeitos colaterais. A recomendação da OMS para o tratamento com pentamidina é 4 mg/kg, aplicados por via endovenosa três vezes por semana. Após a administração de 15 injeções (5 semanas de tratamento) foi observado que 77% dos pacientes com leishmaniose visceral evoluíram para cura e após a administração de 27 injeções (9 semanas de tratamento) o percentual de cura foi de 94% (Berman, 1997). As diamidinas interferem na síntese de poliaminas, inibindo a utilização de *S*-adenosil-L-metionina por inibir enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita (Bacharach *et al.*, 1979; Basselin *et al.*, 1997). Além disso, elas são capazes de se ligar ao DNA em regiões ricas em seqüências A – T (adenina – timina) (Berman, 1997).

A pentamidina usada no tratamento da leishmaniose cutânea apresentou-se menos tóxica do que os antimoniais pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos adversos expressivos, como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão (Berman, 1997). Entretanto, para o tratamento da leishmaniose visceral, sendo necessária a administração de altas doses de pentamidina, os efeitos tóxicos observados são maiores do que os apresentados pelos antimoniais pentavalentes, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia (Berman, 1976). Em 1996, o grupo de Banerjee (1996) propôs o encapsulamento de pentamidina em lipossomas revestidos por açúcares como forma de melhorar o direcionamento do fármaco para as células-alvo, aproveitando os processos de endocitose mediada por receptores.

ANTIBIÓTICOS

Poliênico

A anfotericina B (deoxicolato) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. *Leishmania* e fungos contêm ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas ao invés do colesterol das membranas de células animais. Este lipídeo é um esteróide de 28 carbonos (C-28), dupla ligação em C-22 e uma metila em C-24.

O mecanismo de ação da anfotericina B decorre de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita (Saha *et al.*, 1986; Olliaro, Bryceson, 1993; Urbina, 1997). O uso clínico de anfotericina B é recomendado para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional, com ameaça de morte. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (Berman, 1998).

No final da década de 1990, foram desenvolvidas novas formas farmacêuticas visando diminuir a toxicidade da anfotericina B. Nestas formulações, o desoxicolato foi substituído por outros lipídeos: anfotericina B lipossômica - o AmBisome® (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA), colesterol sulfato de anfotericina B - Amphotec® (Sequs, Menlo Park, CA/EUA) e o complexo lipídico de anfotericina B - Abelcet® (Liposome Co., Princeton, NJ/EUA). Em geral, estas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual, as *Leishmanias* residem, sendo pouco absorvidas pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do fármaco.

Aminoglicosídeo

A paromomicina (aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas induzindo a leitura equivocada do mRNA. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos e causando ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais. A paromomicina é diferente da neomicina B somente na substituição de uma OH por uma amina (NH₂) e possui um espectro de atividade parasitária, que não é apresentada por outro antibiótico aminoglicosídeo. A utilização de paromomicina oral tem sido recomendada para o tratamento de teníase e amebíase. A forma injetável (124 mg/kg dia por 19 dias em média) tem sido utilizada como monoterapia para a leishmaniose visceral, apresentando resultados positivos em estudos clínicos realizados no Quênia e na Índia (Berman, 1997, 1998).

Em outros estudos, a paromomicina associada ao Pentostan® apresentou resultados similares àqueles obtidos quando o antimonial é usado sozinho, mas neste caso o tempo de tratamento foi reduzido à metade (Thakur *et al.*, 1995). Entretanto, a paromomicina pode apresentar nefro e ototoxicidade, afetando o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio. Outro problema com a paromomicina é que o fabricante original interrompeu a produção e sua disponibilidade para uso não está assegurada. Além disso, esse fármaco foi testado em número insuficiente de pacientes para que os efeitos colaterais e a resistência dos parasitas fossem convenientemente avaliados (Berman, 1998).

HEXADECILFOSFOCOLINA (MILTEFOSINA)

Hexadecilfosfocolina ou miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (Unger *et al.*, 1989). O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores (Sindermann *et al.*, 2003) e atualmente despon-ta como a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros (Sundar *et al.*, Jha *et al.*, 1999). Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani* (Croft *et al.*, 1996; Le Fichoux *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação da miltefosina contra *Leishmania* ainda é bastante controverso. Lux *et al.* (2000) mostraram que a síntese de lipofosfoglicano (LPG) e glicoproteína 63 (gp63) está inibida em parasitas tratados com este fármaco. Recentemente, estes mesmos autores (2000) observaram a inibição da enzima 1-acil-2-lisoglicero-3-fosfocolina aciltransferase em promastigotas tratadas com diferentes concentrações de miltefosina. Entretanto, a relevância de tais achados no tratamento clínico ainda não foi evidenciada. É possível que este fármaco atue em *Leishmania* assim como atua em células tumorais, induzindo à apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídeos (Arthur, Bittiman, 1998). Outros estudos sugeriram que este fármaco possui propriedades imunomodulatórias (Eue *et al.*, 1995; Safa *et al.*, 1997; Vehmeyer *et al.*, 1991; Zeisig *et al.*, 1995; Safa *et al.*, 1997). Entretanto, mesmo em camundongos imunodeficientes, este fármaco apresenta atividade antitumoral (Safa *et al.*, 1997) e leishmanicida (Murray *et al.*, 2000), sugerindo que sua atividade não está relacionada com uma resposta imune dependente de célula T (Safa *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2000). Pacientes imunodeprimidos com leishmaniose respondem pobremente aos antimoniais, apresentando níveis de falha e recidivas da ordem de 52% entre 1 e 36 meses após o tratamento (Desjeux, 1999). A miltefosina poderia ser uma alternativa para o tratamento desses pacientes, uma vez que sua ação não está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro. Entretanto, o fármaco parece afetar o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de poder aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, bem com elevar a uremia e creatininemia (Fischer *et al.*, 2001).

OUTROS COMPOSTOS TESTADOS NA QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL ANTILEISHMANIA

Dentre os diversos fármacos sintéticos que estão sendo estudados, muitas pesquisas têm levado em consideração as formas de administração, a saber, oral e tópica. Também há grandes avanços na imunoterapia, com utilização de interferona recombinante humana e outras citocinas (Murray *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003). Dentre os mais usados em estudos *in vitro* e *in vivo*, tem-se; inibidores da síntese de purinas, como o alopurinol, que inibe a captação de purinas de células de mamíferos, através do bloqueio da enzima HGPT do parasita (Berman, 1997; Llorente *et al.*, 2000; Kamau *et al.*, 2001) e o uso de produtos naturais, visto ser importante salientar que a maioria dos fármacos sintéticos são derivados de produtos naturais. Recentemente, Hannaert *et al.* (2003) descre-

veram apropriadamente o mecanismo de ação de extratos de plantas com ação tripanomicida, que interferem em proteínas glicosômicas do parasita.

CONCLUSÃO

A análise dos fatores bioquímicos envolvidos na interação *Leishmania*-hospedeiro mostra que tais parasitas possuem vias metabólicas semelhantes àquelas encontradas em células hospedeiras, logicamente com adaptações que permitem justamente sua sobrevivência. As pesquisas indicam que moléculas presentes tanto na célula hospedeira como em parasitas do gênero *Leishmania* sp. podem interagir; de certa forma, dependendo do nível crítico de produção de compostos microbicidas, induzindo mecanismos que levam à destruição do parasita, ou estratégias de sobrevivência do mesmo, dependendo da regulação imunológica do hospedeiro infectado. Desta forma, muitas pesquisas estão sendo realizadas em torno da análise de elementos dos sistemas de transdução de sinais envolvidos na viabilidade, proliferação e diferenciação em tripanossomatídeos. Assim, uma das maiores razões que levam alguns pesquisadores a procurar desvendar os diferentes mecanismos de escape dos parasitas à resposta imune do hospedeiro reside na capacidade de se manter por longo tempo na célula hospedeira e o estudo de tais estratégias de escape permitem o desenvolvimento de quimioterápicos específicos contra vias metabólicas de *Leishmania* sp.

ABSTRACT

Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracellular molecules as a drug target

The leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites Leishmania sp., that are present in promastigotes or amastigotes forms; the promastigotes infect the sand fly vector, and the amastigotes are the infective forms presented on human macrophages. These protozooses showed two types of clinical manifestations: tegumentar and visceral. The clinical treatments used have shown inefficient; the drugs utilized are presented in injectable form, difficulting the treatment, since to be the patient, may be interned for applications, which are painful. Therefore, for internation, it is necessary monitoring the collateral effects of the drugs, as these medications showed a high toxicity. The leishmaniasis chemotherapy is the target of studies of many research laboratories, that have tested other compounds and plant

extracts with the aim of finding new leishmanicidal agents with lower collateral effects and good bioavailability. Therefore, the researches aimed to find other pharmaceutical forms, that do not lead to patient internation. This paper aims to review the recent advances of the chemotherapy used for leishmaniasis, presenting the pharmacological and biochemical aspects of the participation of intracellular molecules of parasite as the drug targets.

UNITERMS: *Leishmania*. Chemotherapy. Drug target.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J.; JIMENEZ, M. Could infected drug-users be potential *leishmania infantum* reservoirs? *AIDS.*, v.8, p. 854, 1994.
- AMATO, V.S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. Tópicos em terapêutica. *Rev. Bras. Med.*, v. 53, p. 202-212, 1998.
- ARTHUR, G.; BITTMAN R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1390, p. 85-102, 1998.
- BACHARACH, U.; BREM, S.; WERMAN, S.B.; SCHNUR, L.F.; EI-ON, J.; GREENBLATT, C.I. *Leishmania* spp: Effect of inhibitors on growth and on polyamine and macromolecular synthesis. *Exp. Parasitol.*, v. 48, p. 464-470, 1979.
- BANDUWARDENE, R.; MULLEN, A.B.; CARTER, K.C. Immune responses of *Leishmania donovani* infected BALB/c mice following treatment with free and vesicular sodium stibogluconate formulations. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 19, p. 195-203, 1997
- BANERJEE, G.; NANDI, G.; MAHATO, B.; PAKRSHI, A.; BASU, M.K. Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, p. 145-150, 1996.
- BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol.*, v. 85, p.274-282, 1997
- BECKER, J.T.; ULLMAN, B. Biopterin conversion to reduced folates by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 49, p. 21-28, 1991.
- BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.*, v.10, p. 560-586,1988.
- BERMAN, J.D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr. Opin. Infec. Dis.*, v. 11, p. 707-710,1998.
- BERMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of the leishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 27, p.916-920,1985.
- BRUN, R.; BUHLER, Y.; SANDMEIER, U.; KAMINSKI, R.; BACHI, C.J.; RATTENDI, D.; LANE, S.; CROFT, S.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V.; CARAVATTI, G.; FREI, J.; STANEK, J.; METT, H. *In vitro* trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p.1442-1447, 1996.
- CALLAHAN, H.L.; KELLEY, C.; PEREIRA, T.; GROGL, M. Microtubule inhibitors: structure-activity analysis suggest rational models to identify potentially active compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.40, p.947-952, 1996.
- CANTO-CAVALHEIRO, M.M. Estudo de compostos sintéticos com atividade anti-tripanosomatídeos. Avaliação da relação estrutura – atividade. Rio de Janeiro, 1999. 113p. [Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz].
- CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ECHEVARRIA, A.; ARAUJO, C.A.; BRAVO, M.F.; SANTOS, L.H.; JANSEN, A.M.; LEON, L.L. The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Micróbios*, v. 90, p.51-60, 1997.
- CASTILLA, J.J.; MESA-VALLE, C.M.; SANCHEZ-MORENO, M.; ARNEO, T.; ROSALES, M.J.; MASCARO, C.; CRACIUNESCU, D.; OSUNA, A. *In vitro* activity and biochemical effectiveness of new organometallic complex of Osmium (III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *Drug Res.*, v. 46, p.990-996, 1996.

- CASTRO-PINTO, D.B.; ECHEVARRIA, A.; GENESTRA, M.S; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2004.
- CHAKRABORTY, A.K.; MAJUMDER, H.K. Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 26 p. 215-224, 1987.
- 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.*, v. 152, p. 605-612, 1988.
- CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anti-cancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, p. 1041-1047, 1996.
- DAVIDSON, R. N. Practical guide for treatment of leishmaniasis. *Drugs*, v. 56, p. 1009-1018, 1998.
- DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV co-infection. *Clin. Dermatol.*, v. 17, p. 317-325, 1999.
- ECHEVARRIA, A.; SANTOS, L.H.; MILLER, J.; MAHMAD, N. Synthesis, characterization and anti-HIV activity of some 2-*p*-X-phenyl-1,3-*N,N'*-diphenylbenzanimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 6, p. 1901-1904, 1996.
- EUE, I.; ZEISING, R.; ARNDT, D. Alkylphosphocoline-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 12, p. 350-356, 1995.
- FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 2, p. 187-98, 1985.
- FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 190:p. 85-87, 2001.
- FONSECA-GEIGEL, L. A via do óxido nítrico em *Leishmania amazonensis*. Rio de Janeiro, 2000. 89p. [Dissertação de Mestrado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz].
- FONSECA-GEIGEL, L.; LEON, L.L. Cyclic 3'-5' guanosine monophosphate-dependent activity in *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 4, p.499-500, 2003.
- GASSER, J.R.R.A.; MAGILL, A.J.; OSTER, N.; FRANKE, E. D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, p. 83-90, 1994.
- GAUGHAN, D.J.; STEEL, D.M; WHITEHEAD, A.S. Ribozyme mediated cleavage of acute phase serum amyloid A (A-SAA) mRNA in vitro. *FEBS Lett.*, ano 2, v. 374, p.241-5, 1995.
- GENESTRA, M.S; ECHEVARRIA, A; CYSNE-FINKELSTEIN, L; LEON, L.L. Protein kinase A of *Leishmania amazonensis* as a potential target for methoxy-amidine. *Drug Res.*, v. 11, p. 920-923, 2001.
- GENESTRA, M; ECHEVARRIA, A; CYSNE-FINKELSTEIN, L; VIGNÓLIO-ALVES, L; LEON, L.L. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, v. 8, p.1-6, 2003a.
- GENESTRA, M; CYSNE-FINKELSTEIN, L; LEON, L.L. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 192, p. 217-223, 2003b.
- GENESTRA, M; CYSNE-FINKELSTEIN, L; GUEDES-SILVA, D; LEON, L.L. Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on nitric oxide production by *Leishmania* sp. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, v. 18, n.5, p. 445 – 452, 2003c.
- GENESTRA, M 2003d. Proteína quinase A e óxido nítrico sintase como alvos de derivados amidínicos anti-*Leishmania*. Rio de Janeiro, 2003. 301p. [Tese de Doutorado. Fundação Instituto Oswaldo Cruz].
- GLEW, R.H; SAHA, A. K; DAS, S; REMALEY; A.T. Biochem. of the *Leishmania* Species. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 52, p. 412-432, 1998.

- GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIAR-ALVES, F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; CANTO-CARVALHEIRO, M.M.; GENESTRA, M.S.; LEON L.L. The effect of methoxy-amidine on *Leishmania amazonensis* associated to the trypanotione reductase activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 312, 1998.
- GOODWIN, L.G.; PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem. J.*, v. 22, p. 236-240, 1943.
- GRIMALDI JUNIOR, G., TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: Current conceptions and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, New York, v. 6, p. 230-250, 1993.
- GRÖGL, M.; THOMASON, T.N.; FRANKE, E.D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 47, p. 117-126, 1992.
- GUARINO, A.; CASTALDO, A.; DI MARTINO, L.; RUBINO, A.; GAETA, G.B.; GRADONI, L. Visceral leishmaniasis in child with HIV-1 infection. *Eur. J. Pediatr.*, v. 153, p. 301-302, 1994.
- HANNAERT, V.; SAAVEDRA, E.; DUFFIEUX, F.; SZIKORA, J.P.; RIGDEN, D.J.; MICHELS, P.A.; OPPERDOES, F.R. Plant-like traits associated with metabolism of trypanosoma parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 100, n. 3, p. 1067-1071, 2003.
- HARDY, L.W.; MATTHEWS, W.; NARE, B.; BEVERLEY, S.M. Biochemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. *Exp. Parasitol.*, v. 87, p. 157-169, 1997.
- JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, p. 1795-1800, 1999.
- KAMAU, S.W.; NUNEZ, R.; GRIMM, F. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacol.*, v. 1, p. 1-10, 2001.
- KRAUTH-SIEGEL, R.; SCHONECK, R. Trypanotione and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J.*, v. 9, p. 1138-1146, 1995.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, p. 569-596, 1983.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, London, v. 273, p. 595-600, 1978.
- LAZARDI, K.; URBINA, J.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors. Ketoconazole and Terbinafine on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 34, p. 2097-2105, 1990.
- LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D.; KUBAR, J. Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 42, p. 654-658, 1998.
- LIRA, R.; SUNDAR, S.; MKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS, D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian Kala-Azar is due to the emergence of Antimonies-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.*, v. 180, 1999.
- LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.B.; GAMA, V.; SARAVIA, N.G. Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 42, p. 1990-1995, 1998.
- LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 111, p. 1-8, 2000.
- MAGILL, A.J. Epidemiology of leishmaniasis. *Dermatol. Clin.*, v. 13, p. 5055-5023, 1995.
- MAUEL, J.; DENNY, W.; GAMAGE, S.; RANSIJN, A.; WOJCIK, S.; FIGGITT, D.; RALPH, R. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37, p. 991-996, 1993.

- MESA-VALLE, C.M.; MORALEDA, V.; LAZUEN, J.; CRACIUNESCU, D.; PARRONDO-IGLESIAS, E.; OSUNA, A. Action of new organometallic complex against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 47-57, 1997.
- MORONI, G.M.; BOSSI, L. Don't forget visceral leishmaniasis in transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, London, v. 10, p. 563-564, 1995.
- MURRAY, H.W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J.P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect Dis.*, v. 182, p. 1497-1502, 2000.
- NARE, B.; HARDY, L.W.; BEVERLEY, S.M. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 13883-13891, 1997a.
- OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today.*, v. 9, p. 323-328, 1993.
- RANGEL, H.; DAGGER, F.; HERNANDEZ, A.; LIENDO, A.; URBINA, J. Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of Terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, p. 2785-2791, 1996.
- ROBERTS, W.L.; BERMAN, J.D.; RAINEY, P.M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonials preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, p. 1234-1239, 1995.
- SAFA, O.; PARTIN, S.; MATHEW, A.M.; BIBBY, M.C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. *Anticancer Res.*, v. 17, p. 37-43, 1997.
- SAHA, A.K.; MUKHERJEE, J.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 19, p. 195-200, 1986.
- SERENO, D.; HOZMULLER, P.; MANGOT, I.; CURRY, G.; QUAISSI, A.; LEMESRE, J.P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 2064-2069, 2001.
- SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL, K.R.; BOMMER, W.; EIBL, H.J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.*, in press, 2003.
- SLUNT, K.M.; GRACE, J. M.; MACDONALD, T.L.; PEARSON, R.D. Effect of mitonafide analogs on topoisomerase II of *Leishmania chagasi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 706-709, 1996.
- SUNDAR, S.; ROSEMKAIMMER, F.; MAKHARIA, M.K.; GOYAL, A.K.; MANDAL, A.; VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. Trial of oral Miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, v. 352, 1821-1823, 1998.
- TEMPORAL, R.M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ECHEVARRIA, A.; DE SOUZA, M.A.; SERTA, M.; DA SILVA-GONCALVES, A.J.; PIRMEZ, C.; LEON, L.L. Effects of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity. *Drug Res.*, v. 52, p. 489-493, 2002.
- THAKUR, C.P.; BHOWMICK, S.; DOLFI, L.; OLLIARO, P. Aminosidine plus sodium stibogluconate for treatment of Indian Kala-azar: A randomized dose-finding clinical trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, p. 219-223, 1995.
- TRACY, J.B.; WEBSTER JUNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN A.G.; LIMBIRD L.E., eds. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9 ed. McGraw-Hill Companies, 1996. p. 987-1008.
- SANTOS, W.R.; AGUIAR, I.A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; DE LIMA, V.M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, v. 1, n 21, p.4668-4676, 2003.

- ULLMAN, B.; CARRERO-VALENZUELA, E.; COONS, T. *Leishmania donovani*. Isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostan) – Resistant cell lines. *Exp. Parasitol.*, v. 69, p. 157-163, 1989.
- UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E.A.; KIM, D.J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBL, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. *Acta Oncol.*, v. 28, p. 213-217, 1989.
- URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*, v. 114, p. S91-S99, 1997.
- VANNIER-DOS-SANTOS, M.A.; MARTINY, A.; MEYER-FERNANDES, J.R.; DE SOUZA, W. Leishmanial PKC modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 67, p. 112-119, 1995.
- VEHMEYER, K.; SCHEURICH, P.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocoline-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin-2. *Cell Immunol.*, v. 137, p. 232-238, 1991.
- WANG, C. C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. *Parasitology*, v. 114, p. S31-S44, 1997.
- WERBOVETZ, K. A.; BRENDLE, J.J.; SACKETT, D.L. Purification, characterization and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 98, p. 53-65, 1999.
- WERBOVETZ, K.A.; LEHNERT, E.K.; MACDONALD, T.L.; PERASON, R.D. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, p. 495-497, 1992.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of the leishmaniasis*. Geneve: WHO, 1990. p. 158. (Technical Report, Series 793).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical diseases. Leishmaniasis control latest epidemiological data. Disponível em: < <http://www.who.int/ctd/html/leisepidat.html> >. Acesso em: 20 ago. 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The leishmaniasis. Geneve: WHO, 1984. p. 99-109. (Technical Report Series, v. 70).
- ZEISIG, R.; RUDOLF, M.; EUE, I.; ARNDT, D. Influence of hexadecylphosphocoline on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages *in vitro*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 121, p. 69-75, 1995.

Recebido para publicação em 17 de outubro 2003.