

LEISHMANIOSES: “ESTADO DA ARTE”

Ivan de Oliveira PEREIRA^{1,*}

Luis Vitor Silva SACRAMENTO²

Marcos José MARQUES³

RESUMO: Não há vacinas disponíveis contra leishmanioses. A resistências às drogas, eficácia variável, toxicidade, administração parenteral e a necessidade de longos períodos de tratamento representam os principais desafios das atuais drogas leishmanicidas. Infecções por protozoários do gênero *Leishmania* representam um grande problema de saúde, com alta endemicidade em países em desenvolvimento. As drogas de escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, que apresentam toxicidade renal e cardíaca, assim, existe uma grande necessidade de tratamentos contra leishmanioses mais seguros e efetivos.

Palavras chave: Leishmanioses, tratamentos, *Leishmania*

ABSTRACT: There is no vaccine available against leishmaniasis. Drug resistance, variable efficacy, toxicity, parenteral administration, and requirement for long courses of administration are the main drawbacks of current leishmanicidal drugs. Infections by protozoans of the genus *Leishmania* are the major worldwide health problem, with high endemicity in developing countries. The drugs of choice for the treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials, which exert renal and cardiac toxicity, thus, there is a strong need for safer and more effective treatments against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, treatments, *Leishmania*

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, MG, Brasil;

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brasil;

³ Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil.

* Autor correspondente - E-mail: ivan.farma@yahoo.com.br - Fone: +55 (35) 3239-1231

1 ASPECTOS GERAIS - LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. Este conjunto de doenças possui, além do impacto sócio-econômico, a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária (LAINSON; SHAW, 1992). Os protozoários da ordem Kinetoplastida se caracterizam pela presença de uma estrutura rica em DNA, denominada cinetoplasto (LAINSON; SHAW, 1987).

Existem evidências de que esta doença já estivesse presente nas Américas nas civilizações pré-inca, antes da chegada dos conquistadores neste continente. Todavia, a primeira descrição científica foi feita por Leishman e Donovan em 1903.

Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas. As formas cutâneas, que se caracterizam por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; a forma cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; a forma mucocutânea, que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato; e as formas viscerais, que se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de

peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (HEPBURN, 2000).

A forma clínica cutânea da leishmaniose também é conhecida como ferida brava ou úlcera de Bauru. Esta é a forma mais comum de leishmaniose e caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas de vários tipos, geralmente manifestando-se como úlcera crônica que pode disseminar progressivamente afetando linfonodos e causando metástases (ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2000).

Depois de um período de incubação, que varia de duas semanas a dois meses aparece a lesão inicial, que é geralmente única, crescendo lentamente e ulcerando depois de alguns meses. As lesões podem chegar a medir vários centímetros com características típicas como contornos regulares, inodoras, pouco exsudativas e com fundo granuloso. Também se observam outros tipos de lesões como ulcero-crostosas, ectimatóides, úlcero vegetantes, verrucosas e outras. As lesões da pele podem curar espontaneamente, deixando cicatrizes visíveis após curso crônico de meses a anos (REY, 2001).

Na forma cutânea difusa, as lesões são papulosas ou nodulares deformantes, não se observando ulceração das lesões. Estas se distribuem amplamente na superfície corporal, onde são encontrados abundantes macrófagos repletos de amastigotas (WALTON, 1987). Esta forma de leishmaniose se apresenta raramente, não cura espontaneamente, é de

difícil tratamento e apresenta recaída após a terapia (SOUZA et al., 2006).

A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se por lesões tardias, que surgem geralmente meses ou anos após a cura de uma lesão cutânea (WALTON, 1987), preferencialmente no tabique auricular ou nasal, que se estende progressivamente aos tecidos moles, com inflamação e ulceração. Posteriormente a lesão se aprofunda, e nestas lesões se encontram poucos parasitos (MARKELL; JOHN; KROTASKI, 2003).

A leishmaniose visceral, também chamada Kalazar, febre negra ou esplenomegalia tropical, é uma doença crônica e endêmica em várias regiões do mundo, afetando especialmente crianças e pessoas imunodeprimidas, caracterizando-se por febre irregular e esplenomegalia (SILVA et al., 2001). O período de incubação varia de dois a oito meses. O início da doença é insidioso; com perda de apetite; palidez; aparecimento de febre alta que é o sintoma mais notável pela sua constância; aumento de volume do baço; anemia e hemorragias da gengiva e digestiva (FURTADO, 1994). A alteração do apetite leva a desnutrição grave e a evolução da doença pode ser rápida, levando à morte em algumas semanas. Além disso, a susceptibilidade a diversas infecções bacterianas pode agravar o quadro clínico (SAMUELSON, 2000). Os pacientes podem apresentar uma forma crônica assintomática

desta doença, com curso lento que pode durar anos, ou a forma aguda que é rápida e fatal.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses acometem 12 milhões de pessoas no mundo, em 88 países tropicais e subtropicais, sendo 72 desses considerados em vias de desenvolvimento. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de se contrair a leishmaniose, com 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano.

Segundo a OMS, de 1 a 1,5 milhões de casos anuais correspondem a forma cutânea, ocorrendo principalmente em países em vias de desenvolvimento, na Ásia, África e América Latina. Cerca de 90% dos casos estão concentrados entre Afeganistão, Algéria, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria, na África, e no Brasil e Peru, nas Américas (ASHFORD, 2000). A incidência de leishmaniose visceral chega a aproximadamente 0,5 milhão de casos, sendo a maioria destes na Índia, Sudão, Bangladesh e Nepal, na África e Ásia, e no Brasil, nas Américas, onde está distribuída desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003). Esta forma da doença possui uma vasta distribuição geográfica, incluindo regiões tropicais, subtropicais, e certas zonas temperadas, sendo considerada endêmica em parte da Ásia, Índia, América Central e do Sul, Baixo Mediterrâneo e alguns países da Europa (LAINSON; SHAW, 1992).

No Brasil tem-se observado, na última década, a expansão das áreas

consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como a eclosão de surtos epidemiológicos em regiões antes consideradas livres dessas doenças. Entre os fatores que contribuem para este crescimento temos indivíduos que visitam áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006), além de surtos epidêmicos associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (DESJEUX, 2001).

Em relação ao agente etiológico vale destacar que os membros da família Trypanosomatidae apresentam divisão binária simples, e podem parasitar somente invertebrados, ou então apresentar um ciclo de vida heteroxênico tendo como hospedeiros tanto invertebrados quanto vertebrados. A família Trypanosomatidae compreende gêneros tais como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*, os quais são parasitos de invertebrados, vertebrados e plantas (CAMARGO et al., 1997).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Os parasitos do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção

suprapilária) (LAINSON; SHAW, 1987). O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000).

2 LEISHMANIOSE E HIV

A co-infecção, HIV/*Leishmania* é descrita em 35 países. Com aproximadamente 2000 casos notificados, 1911 ocorreram na região do Mediterrâneo, principalmente na Espanha, França, Itália e Portugal, onde a leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença emergente que acomete, principalmente, os usuários de drogas endovenosas, e de alta prioridade para a OMS (DESJEUX; ALVAR, 2003). Nessa região, mais de 70% dos casos em adultos de LV estão relacionados a HIV/AIDS e mais de 9% dos casos de AIDS apresentaram co-infecção com *Leishmania*. A prevalência da LV em pacientes infectados pelo HIV no Mediterrâneo é de 2 a 9%, cerca de 500 vezes maior que em pacientes não infectados pelo HIV (GRADONI; SCALONE; GRAMICCIA, 1993).

Desde 1998, 28 instituições de diversos países, incluindo a região do Mediterrâneo, África e Índia, entre outros, estabeleceram uma rede de vigilância que notifica casos novos de co-infecção a OMS numa estratégia de monitoramento, padronização, melhoria nos recursos

diagnósticos e manejo dos pacientes. Esta política se iniciou em 1994 quando a OMS instituiu um grupo então com 13 instituições européias na tentativa de monitorar o impacto do agravo (DESJEUX; ALVAR, 2003).

Rabello et al. (2003) analisaram 91 casos no Brasil até 2003. Desses, 7% eram usuários de drogas endovenosas, 91% do sexo masculino e quando a forma clínica foi avaliada, 63% apresentaram a forma tegumentar (20% cutâneo e 43% mucosa ou mucocutânea) e 37% formas viscerais da doença.

Relatos recentes chamam atenção para a sobreposição da distribuição geográfica da leishmaniose e pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), tornando-se a *Leishmania* um organismo oportunista (LUZ et al., 2001). A dupla infecção produz efeito somatório na deficiência da resposta imune uma vez que *Leishmania* e HIV acometem células do sistema imunológico, aumentando exponencialmente a intensidade e conseqüências das doenças. Muitas das co-infecções relatadas nas Américas ocorrem no Brasil, onde as transmissões pelo HIV estão se espalhando para áreas rurais e a LV tem se urbanizado, aumentando o risco de sobreposição das doenças (WHO, 1991).

3 CICLO BIOLÓGICO DA *Leishmania*

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou *Phlebotomus*, no Velho Mundo (ROBERTS; JANOVY, 2000). Esses pequenos dípteros têm preferência por lugares úmidos e quentes. Estima-se que existam cerca de 400 espécies de flebotomíneos nas Américas, sendo que 50 dessas parecem estar envolvidas na transmissão da *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1999). Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Dentre esses, temos uma ampla variedade de roedores, canídeos, marsupiais e humanos. Geralmente o homem participa do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental, quando entra em ambientes de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

O protozoário *Leishmania* apresenta duas formas no seu ciclo de vida: a forma extracelular promastigota, que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela relacionada à locomoção do parasito no tubo digestivo do inseto, e a forma amastigota, que é ovalada, não apresenta flagelo visível e é encontrada no interior dos

fagolisossomos dos macrófagos (FIGURA 1)

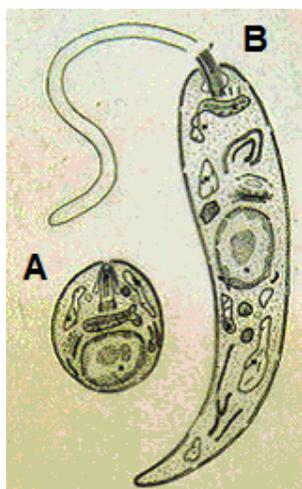


FIGURA 1: Formas evolutivas do protozoário *Leishmania*. A: amastigota; B: promastigota.

O vetor pode se infectar ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. Após a lise do macrófago infectado as amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária, transformando-se, após alguns dias em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e não têm a capacidade de se dividir. Os promastigotas metacíclico, infectantes, migram para a probóscida do inseto e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (SACKS; KAMHAWI, 2001).

Os promastigotas inoculados sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e então infectam os

(ROBERTS; JANOVY, 2000).

macrófagos. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, onde as formas promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem as condições favoráveis para a diferenciação em amastigotas, que se dividem, lisam o macrófago e infectam novas células, repetindo o ciclo (SACKS; KAMHAWI, 2001). A sobrevivência intracelular do parasito pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS, 1974), uma vez que estas formas encontram-se melhor dotadas bioquimicamente e enzimaticamente para resistirem aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (PEARSON et al.,1983).

4 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

As formas amastigotas localizadas no interior dos macrófagos são organismos acidófilos, capazes de resistirem à ação microbicida das hidrólises ácidas, liberando lisoenzimas para sobreviver e multiplicar-se por divisão binária, até causar a lise da célula, sendo então fagocitadas novamente por outros macrófagos (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

Sobre a infecção do homem e de várias outras espécies de mamíferos por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, existe a dependência de complexas interações entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, que determinam a apresentação clínica e o

curso evolutivo das leishmanioses. Estas interações se realizam entre duas formas do ciclo evolutivo do parasito e os macrófagos do hospedeiro (HARKER, 1992).

Na última década, as proteases dos parasitos receberam considerável atenção dos pesquisadores. Este fato levou à análise de sua importância na interação parasito-hospedeiro. Um parasito bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica do mesmo. As proteases participam de muitos dos mecanismos que os parasitos utilizam para persistirem no hospedeiro. Nos últimos anos, houve avanços no conhecimento sobre mecanismos de degradação protéica intracelular, tendo sido descritas várias novas famílias de proteases assim como novos agentes inibidores (PEREIRA et al., 2011).

5 A IMPORTÂNCIA DAS PROTEASES - seu papel nas interações entre parasitos e hospedeiros

Os parasitos garantem sua perpetuação dentro de seus hospedeiros através da produção de muitas moléculas, que ativam mecanismos de sobrevivência. Entre essas moléculas, as proteases são cruciais no ciclo de vida e patogenia, em especial da leishmaniose (SADIJ; MCKERROW, 2002). Estas enzimas têm sido implicadas em uma grande variedade de mecanismos de

adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que incluem modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito, e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manter a infecção (SADIJ; MCKERROW, 2002).

Proteases ou peptídeo-hidrolases são enzimas capazes de provocar a quebra de ligações peptídicas, tendo uma ampla distribuição filogenética. Com base no mecanismo de ação e comparação entre os sítios ativos, quatro classes de proteases são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica: serino proteases, cisteíno proteases, aspartato proteases e metaloproteases (GRZONKA et al., 2001; POWERS, 2002).

As serino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica. A catálise ocorre via formação de um estado de transição tetraédrico durante as etapas de acilação e desacilação. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase e as calicreínas são exemplos de serino proteases (POWERS, 2002).

As cisteíno proteases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima, que atua de forma semelhante ao resíduo de serina das serino proteases. A catálise ocorre via um intermediário tiol-éster e é facilitada

pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. São exemplos de cisteíno proteases, a papaína, as catepsinas e as calpaínas, sendo que as principais funções fisiológicas destas moléculas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, e estas enzimas também estão envolvidas em várias patologias (SEGUNDO, 1993). Nas aspartato proteases existem dois resíduos de ácido aspártico no centro ativo da enzima, um dos quais, na faixa de pH ótimo (em torno de 2 a 3) encontra-se ionizado, enquanto o outro não. São exemplos de proteases pertencentes a esta classe, a pepsina e a renina (SIMÕES; FARO, 2004). As metaloproteases caracterizam-se por possuir um átomo de metal, comumente o zinco, localizado no centro ativo da enzima. O metal é essencial para a catálise, fornecendo uma forte atração eletrofílica para auxiliar o ataque à ligação peptídica de uma molécula de água. A carboxipeptidase e a termolisina são exemplos desta classe de proteases (DECLERCK, 2000).

As cisteíno proteases são um dos potenciais alvos para diagnóstico, e candidatos para desenvolvimento de drogas e vacinas sendo extensivamente estudados em diferentes organismos patogênicos. Estas proteases de parasitos também estão implicadas em muitos processos, incluindo diferenciação, nutrição, infecção da célula hospedeira e fuga da resposta imune do hospedeiro (SAJID; MCKERROW, 2002). As cisteíno proteases (CPA e CPB) tipo catepsina L têm-se mostrado necessárias para a

sobrevivência de *Leishmania mexicana* dentro de macrófagos *in vitro* (DENISE et al., 2003), uma vez que ela é predominantemente expressa e ativa em amastigotas e menos intensamente em promastigotas metacíclicas (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Essa observação, junto com o fato da *Leishmania* não crescer dentro de macrófagos na presença de inibidores de CP, sugerem que as CP são necessárias para o parasitismo intracelular ser bem sucedido (MOTTRAM et al., 1996).

Em estudos recentes têm também sido demonstrados que estas proteases agem ainda como moduladoras da resposta imune do hospedeiro à *L. mexicana* (BUXBAUM et al., 2003). Em outros estudos como os de inibição em *Leishmania chagasi* indicam que cisteíno proteases ajudam na infecção e sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos (MUNDODI; KUCKNOOR; GEDAMU, 2005).

As cisteíno proteases estão implicadas na invasão de eritrócitos humanos por *Plasmodium falciparum* (MAYER et al., 1991) e são consideradas como fatores de virulência na patogênese da *Entamoeba histolytica* (QUE; REED, 2000). A atividade de cisteíno proteases é necessária para a sobrevivência da *Leishmania (L.) mexicana* (DENISE et al., 2003) e *Trypanosoma cruzi*, *in vitro* (HARTH et al., 1993).

As proteases têm um papel importante nos mecanismos patogênicos e nos eventos de diferenciação de protozoários parasitas. O

papel principal da atividade proteolítica de proteases na regulação da homeostase celular foi muito bem descrito em várias espécies de leveduras e eucariotos superiores, como também no tripanosoma africano, *T. brucei* (TO; WANG, 1997).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida dos protozoários podem estar condicionadas à presença de proteases. Isto porque uma característica marcante do ciclo de vida dos protozoários parasitos é o profundo remodelamento morfológico que eles sofrem durante o seu desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Algumas das mudanças mais marcantes ocorrem quando os parasitos deslocam-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Todas estas mudanças morfológicas envolvem a reestruturação de organelas, como flagelos e cinetoplastos; e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma. Um bom exemplo desta função das proteases foi estudado por Gonzáles et al. (1999), que demonstraram que as proteases são necessárias para o encistamento de *Entamoeba invadens*, um protozoário de répteis.

O papel das proteases no remodelamento de protozoários parasitos também foi descrito em *T. cruzi*. Foi demonstrado que a lactacistina inibe a transformação de tripomastigotas em amastigotas e também o desenvolvimento de amastigotas em tripomastigotas. Em relação à infectividade dos parasitos, estes autores

demonstraram que a lactacistina não afeta a invasão de mioblastos por tripomastigotas; entretanto, o desenvolvimento intracelular dos parasitos é inibido (GONZALEZ et al., 1996). Resultados similares foram obtidos com outros protozoários parasitos como o *Plasmodium sp.*, mostrando que este tratamento inibe o seu desenvolvimento em formas exoeritrocitárias mas não altera sua capacidade de invasão (GANTT et al., 1998).

Também em *Toxoplasma gondii*, o tratamento dos taquizoítos com lacticistina não interferiu na entrada dos parasitos na célula hospedeira e nem no estabelecimento do vacúolo parasitóforo. Entretanto, o crescimento e replicação dos parasitos foram bloqueados (SHAW et al., 2000). Além disso, o bloqueio da invasão em muitos parasitos, incluindo *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (CONSEIL; SOETE; DUBREMETZ, 1999) tem sido observado devido ao uso de inibidores específicos de serino proteases. Entre Tripanosomatídeos, uma serino peptidase extracelular de *Trypanosoma cruzi* foi relatada (SANTANA et al., 1997). Esta enzima é essencial para a disseminação do parasito pelos tecidos do hospedeiro, porque ela foi altamente ativa contra proteínas de tecidos conectivos como colágeno tipo I e IV, conseqüentemente foi identificado como um bom alvo terapêutico para a doença de Chagas (SANTANA et al., 1997).

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero

Leishmania foi até hoje demonstrada apenas na espécie *Leishmania mexicana*. Robertson (1999) observou a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após tratamento com inibidores de proteases. Durante seu desenvolvimento no hospedeiro, a *Leishmania* libera antígenos em seu ambiente, especialmente proteínas que têm sido consideradas como fatores de virulência (CHANG et al., 2003).

As proteases extracelulares do parasito têm um papel crucial no seu ciclo de vida e na patogenia causada por ele (MCKERROW et al., 1993). Elas têm sido associadas a uma ampla variedade de mecanismos de adaptação, para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que além da modulação da resposta do sistema imune, incluem a invasão e destruição de tecidos, capacidade do parasito migrar para locais específicos para o crescimento e desenvolvimento e/ou adquirir nutrientes essenciais que garantem a sobrevivência e proliferação para manutenção da infecção (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

Considerando a grande porcentagem de cisteíno proteases conhecidamente presente em *Leishmanias*, e a fundamental importância desta para a sobrevivência e virulência do parasito, este grupo de proteases representa um importante alvo no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como descrito por Pereira et al. (2011).

6 TRATAMENTOS

O antimônio foi introduzido na terapêutica médica no século XV, empregado para diversas afecções. Sua toxicidade e ineficácia em muitos pacientes fizeram com que seu uso fosse proibido. Em 1630, o sal de antimônio trivalente, denominado emético, foi introduzido na medicina. Sua utilização foi novamente abandonada nos séculos XVIII e XIX, até que, em 1907, foi relatada a atividade do tártaro emético contra tripanossomas africanos. Em 1912 foram publicados os resultados obtidos por Vianna no tratamento da úlcera de Bauru e, cerca de três anos depois, o tártaro emético já estava sendo amplamente empregado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, sendo responsável pela redução da mortalidade dessa doença, de cerca de 90 para 5% dos pacientes (BRYCESON, 2000).

Os antimoniais trivalentes, extremamente tóxicos, foram, a partir de 1920, substituídos pelos antimoniais pentavalentes e, a partir dos anos 40, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumine passaram a representar os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (CROFT; YARDLEY, 2002).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está bem esclarecido. Dentre os vários alvos potenciais, descritos como responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* estão a glicólise (BERMAN; GALLALEE;

BEST, 1987), DNA topoisomerase I (LUCUMI et al., 1998), oxidação de ácidos (BERMAN et al., 1989) e tripanotona redutase (CUNNINGHAM; ZVELEBIL; FAIRLAMB, 1994). Há ainda evidências de que antimoniais poderiam agir desencadeando apoptose (SERENO et al., 2001).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são administrados por via parenteral. No interior do macrófago, são convertidos em antimoniais trivalentes (Sb^{III}), compostos mais tóxicos contra os dois estágios de *Leishmania* (FREZARD et al., 2001) e também para o homem.

Estas drogas induzem uma variedade de efeitos adversos (alguns deles bem graves) tais como: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitações, insônia, nervosismo, insuficiência renal, arritmias, anemia e tosse (KHAW; PANOSIAN, 1995). Outros efeitos como supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e pancreatite química também podem ocorrer (HEPBURN, 2000). A eficácia destas drogas é variável devido à dosagem baixa e descontínua, sendo as causas de maior importância no número de recaídas e resistência de *Leishmania* (SUNDAR et al., 2001).

A Anfotericina B (FIGURA 2) é a droga de segunda escolha, sendo altamente efetiva no tratamento das leishmanioses resistentes aos antimoniais (OLLIARO; BRYCESON, 1993). O metabolismo dos

esteróis em *Leishmania* é particular, sendo o ergosterol o mais importante esteroide de membrana neste parasito, o que o diferencia da célula hospedeira, onde o colesterol é o componente esteroide predominante na membrana plasmática (BEACH; GOAD; HOLZ, 1998). O macrolídeo anfotericina B tem alta afinidade por episterol, que é um precursor do ergosterol (SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006), o que leva a uma alteração na composição da membrana, produzindo poros e alterando a permeabilidade, causando o escape de íons e, portanto, morte do parasito (BALANA-FOUCE, 1998).

A anfotericina B é administrada por via endovenosa, sendo seu uso limitado devido à sua toxicidade, apresentando efeitos como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (KHAW; PANOSIAN, 1995). Novas formulações de anfotericina B associada a lipídeos conferem propriedades peculiares resultando na preferencial sensibilidade de macrófagos infectados por *Leishmania* além de apresentarem grande redução da toxicidade (SEAMAN et al., 1995).

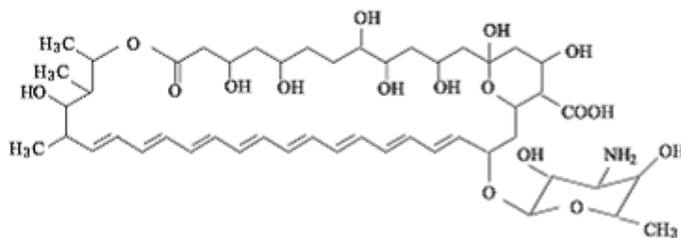


FIGURA 2: Estrutura química da anfotericina B

A pentamidina (FIGURA 3) é uma diamina aromática que pode ser usada em casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais (HERWALDT, 1999). Tem sido aplicada no Brasil principalmente para o tratamento de infecções por *L. (V.) guyanensis*, que geralmente respondem mal ao tratamento com antimoniais. Seu mecanismo de ação não está bem definido, mas parece ocorrer inibição da síntese das poliaminas arginina, petruscina e espermidina (BRAY et al., 2003). Esta droga também pode atuar como intercalante de DNA do cinetoplasto e da mitocôndria, interferindo na replicação, transcrição, ou ambas (BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998).

Esta diamina pode ser administrada por via endovenosa, e com frequência produz efeitos adversos como taquicardia, hipotensão, dor de cabeça, vômitos, náuseas, erupção cutânea, disfunção renal e outros como hipoglicemia ou hiperglicemia (CONTE, 1991). Menos frequentemente, induz arritmias, alucinações, leucopenia, febre e hipocalcemia (VOHRINGER; ARASTH, 1993).

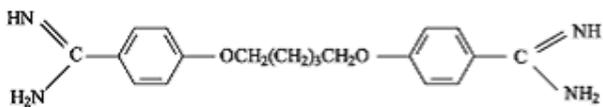


FIGURA 3: Estrutura química da pentamidina

A paromomicina (FIGURA 4) é um antibiótico da família dos aminoglicosídeos que, além da aplicação parenteral, está sendo avaliada por via tópica em leishmaniose cutânea (EL-ON et al., 1992). Seu mecanismo de ação é desconhecido, mas sabe-se que altera a síntese de proteína e sugeriu-se que interfere na cascata mitocondrial, com a perda do potencial de membrana e respiração, através da inibição no abastecimento de substratos para o metabolismo da mitocôndria (MAAROUF et al., 1997a). Existem também evidências de que este antibiótico altere a captação de precursores de macromoléculas dificultando o crescimento do parasito. E de que altere a composição de lipídeos na membrana, provocando diminuição na fluidez (MAAROUF et al, 1997b).

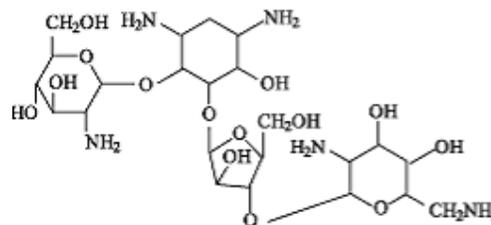


FIGURA 4: Estrutura química da paramomicina

O Miltefosine é um derivado alquil-lisofosfolípídico, com atividade antiproliferativa, que foi inicialmente testado por suas propriedades anti-tumorais. Recentemente, começou a ser utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral, constituindo-se na primeira droga bem

sucedida por via oral (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Esta droga está sendo avaliada em diferentes partes do mundo. Os testes realizados na Índia indicaram boa atividade contra leishmaniose visceral, com eficácia de 95% (BHATTACHARYA et al., 2007). Já nas Américas, testada para o tratamento de leishmaniose cutânea, apresentou diferentes resultados clínicos. Na Colômbia, sua utilização levou a cura em 91% dos pacientes, enquanto que na Guatemala a eficácia foi de 53% (SOTO; BERMAN, 2006). A atividade do miltefosine contra *Leishmania* está relacionada à alteração da composição da membrana, com redução do conteúdo de fosfatidilcolina e ergosterol (RAKOTOMANGA et al., 2007).

As reações adversas mais frequentes, relacionadas ao uso de miltefosine são distúrbios gastrointestinais transitórios como vômitos e diarreia. A maior limitação ao seu uso até o momento está relacionada aos efeitos teratogênicos (BHATTACHARYA et al., 2004).

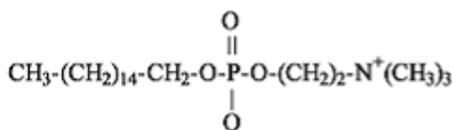


FIGURA 5: Estrutura química do miltefosine

Um outro grupo de drogas em estudo na atualidade é representado por bifosfonatos, como residronato e pamidronato. Estes compostos parecem interferir na síntese de

farnesil pirofosfato e geranyl pirofosfato, que são metabólitos chave para a isoprenilação de proteínas (MARTIN et al., 2001). São compostos com atividade leishmanicida, mas também apresentam alta toxicidade (RODRIGUES et al., 2002).

A atividade leishmanicida foi também demonstrada para compostos azólicos, tais como cetoconazol e itraconazol (URBINA, 1997), mas testes clínicos revelaram ineficácia no tratamento de leishmaniose humana (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Mais recentemente, um outro fármaco desse grupo, o fluconazol, está sendo testado para a forma cutânea com resultados favoráveis, devido a sua alta concentração na pele. O mecanismo de ação destes compostos está baseado na inibição da síntese do lanosterol (OLLIARO; BRYCESON, 1993). Seus efeitos colaterais são geralmente hepatotoxicidade, prejuízo na produção de testosterona e disfunção renal (VIDAL-PUIG et al., 1994).

O alopurinol é utilizado como substrato de várias enzimas na via das purinas em tripanosomatídeos, podendo ser seletivamente incorporado em vários nucleotídeos intermediários no parasita e, portanto, levando a inibição da síntese de novas purinas (MARR, 1991). Usado no tratamento de leishmaniose canina, tem pouca eficácia em humanos, devido ao rápido metabolismo e excreção do fármaco, mas poderia ter aplicação em combinação com outras drogas (NELSON et al., 1979).

6.1 Resistência ao tratamento

Durante mais de 70 anos, apesar de sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como drogas de primeira escolha para tratar leishmanioses cutânea e visceral. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas de tratamento contra esta doença, no entanto, problemas com efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação, seguem sendo os grandes problemas.

Além da toxicidade que possuem os medicamentos anti-*Leishmania*, outro grave problema que dificulta o tratamento da doença recai no desenvolvimento de resistência pelo parasito (THAKUR et al., 2001). Temos assim, que o uso de antimoniais como primeira linha de tratamento em muitas partes do mundo está ameaçado, dado o desenvolvimento de resistência nos últimos 15 anos. Recentemente, estudos demonstraram que na Índia quase 80% dos parasitos isolados são resistentes aos antimoniais (SUNDAR et al., 2001). Um dos mecanismos de resistência induzida aos antimoniais já identificados é a amplificação do gene que codifica um transportador do tipo ABC, responsável pela extrusão da droga (HAIMEUR; OUELLETTE, 1998). Outros mecanismos, entretanto, parecem estar

associados à resistência natural (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003).

No caso das drogas de segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina, não parece que a resistência seja um limitante para seu uso clínico (PEREZ VICTORIA et al., 2006). Até o momento, não existem registros de resistência aos compostos ainda em fase de avaliação para o tratamento de leishmaniose como paromomicina, azóis e bifosfonatos, possivelmente devido a seu uso limitado até o momento. Entretanto, sabe-se que a obtenção de cepas resistentes *in vitro* ao miltefosine é bastante fácil, pelo que as expectativas de seu uso em larga escala se tornam um tanto quanto limitadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste contexto, considerando o grande impacto das leishmanioses nas sociedades atuais, estando presente tanto a norte quanto a sul da linha do Equador, diferentemente de muitas outras parasitoses que se caracterizam por serem doenças de “países pobres”; as dificuldades nos tratamentos atuais, que embora tenham sofrido algum desenvolvimento ainda encontram-se muito aquém do ideal, o que é agravado pela emergência de cepas resistentes, a busca por compostos ativos, que possam dar origem a novas drogas anti-*Leishmania* apresenta-se como uma necessidade urgente. Assim, substâncias químicas provenientes de recursos naturais representam uma grande fonte de

compostos, os mais variáveis possíveis, que merecem ser investigadas quanto as suas atividades biológicas, na esperança da obtenção de uma entidade química mais eficaz para o tratamento das leishmanioses e menos tóxica para o hospedeiro humano (PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Inter. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

BALANA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 3, p. 241-247, 1998.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; ROBERT-GERO, M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Acta Trop.**, v. 70, n. 1, p. 43-46, 1998.

BEACH, D. H.; GOAD, L. J.; HOLZ, G. G. J. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 31, n. 2, p. 149-162, 1998.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 197-201, 1987.

BERMAN, J. D. et al. Biochemistry of pentostan resistant *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med.**, Hyg., v. 2, n. 40, p. 159-164, 1989.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian

visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 217-221, 2004.

BRAY, P.G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRYCESON, A. Visceral leishmaniasis in India. **Lancet.**, v. 356, p. 1399, 2000.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, 4, p. 701-711, 2002.

BUXBAUM, L. U. et al. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **The Journal of Immunology**, 171, p. 3711-3717, 2003.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.**, v. 159, n. 12, p. 6131-6139, 1997.

CHANG, K. P. et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, 85, p. 375-390, 2003.

CONSEIL, V.; SOETE, M.; DUBREMETZ, J. F. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46, p. 1358-1361, 1999.

CONTE, J. J. Pharmacokinetics of intravenous pentamidine in patients with normal renal function or receiving hemodialysis. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 1, p. 169-175, 1991.

- CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol., Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, n. 1, p. 285-295, 1994.
- DeCLERCK, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. J. of Cancer.**, v. 36, p. 1258-1268, 2000.
- DENISE, H. et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 60, p. 3190-3195, 2003.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania/HIV* co-infections: epidemiology in Europe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 3-15, 2003.
- EL-ON, J. et al. Topical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: A double-blind control study. **J. Am. Acad. Derma.**, v. 27, n. 2, p. 227-231, 1992.
- FREZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.
- FURTADO, T. A. **Doenças Infecciosas com Manifestações Dermatológicas**. In: Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1994. cap. Leishmaniose, p. 319-338.
- GANTT, S. M. et al. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium spp.* **Antimicrob. Agents and Chemother.**, 42, p. 2731-2738, 1998.
- GONZALEZ, J. et al. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **J. Exp. Med.**, 184, p. 1909-1918, 1996.
- GRADONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 1, p. 94-96, 1993.
- GRZONKA, Z. et al. structural studies on cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim. Pol.**, v. 49, n. 1, p. 1-20, 2001.
- HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1689-1694, 1998.
- HARKER, P. R. **Interação de promastigotas de Leishmania (Viannia) braziliensis com macrófagos da linhagem U-937**. f. 67, Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – faculdade de ciências da Saúde, universidade de Brasília, Brasília, 1992.
- HARTH G, et al. Peptide- fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 58, p. 17-24, 1993
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- KHAW, M.; PANOSIAN, C. B. Human antiprotozoal therapy: past, present and

- future. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 427-439, 1995.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.
- LAISON, R.; SHAW, J. J. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Evolution, classification and geographical distribution**, p. 1-120.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, 44, p. 94-105, 1992.
- LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic by *Leishmania mexicana mexicana*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, p. 327-336, 1974.
- LUCUMI, A. et al. Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable dnaprotein complexes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 8, p. 1990-1995, 1998.
- LUZ, Z. M. P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 249-254, 2001.
- MAAROUF, M. et al. *In vivo* interference of paramomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Exp. Cell. Res.**, v. 232, n. 2, p. 339-348, 1997a.
- MAAROUF, M. et al. Biochemical alterations in paramomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 2, p. 98-102, 1997b.
- MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTASKI, W. A. Parasitologia Médica. In: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. **Outros Protozoários que Habitam o Sangue e os Tecidos**, p. 115-176.
- MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, n. 2, p. 111-119, 1991.
- MARTIN, M. B. et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosome brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* ad *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem.** v. 44, n. 6, p. 906-916, 2001.
- MAYER, R. et al. Peptide derivatives specific for a *Plasmodium falciparum* proteinase inhibit the erythrocyte invasion by merozoites. **J. Méd. Chem.**, v. 34, p. 3029-3035, 1991.
- MCKERROW, J. H. et al. The proteases and the pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review Microbiology**, v. 47, p. 821-853, 1993.
- MOLYNEUX, H. D.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Morphology, ultrastructure and life cycles**, p. 551-582.
- MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 455-460, 1998.
- MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 93, p. 6008-6013, 1996.
- MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A. S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Molecular Biology**, v. 6, p. 3, 2005.
- NELSON, D. J. et al. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent.

- Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 22, p. 11544-11549, 1979.
- OLLIARO, P.; BRYCESON, A. D. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993.
- PEARSON, R. D. et al. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1994-1999, 1983.
- PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p.339-345, 2010.
- PEREIRA, I. O. et al. Natural Products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* Protease Inhibitors. **J Med Food**, v. 14, n. 6, p. 557-562, 2011.
- PEREZ VICTORIA, F.J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, n. 1-2, p. 26-39, 2006.
- POWERS, J. C. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.
- QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 13, p. 196-206, 2000.
- RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania*/HIV co-infecção in Brazil: an appraisal. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.
- RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. J. Foundations of parasitology. In: . New York: McGraw-Hill, 2000. cap. **Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin**, p. 55-81.
- ROBERTSON, C. D. The *Leishmania mexicana* proteasome. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, v. 103, p. 49-60, 1999.
- RODRIGUES, N. et al. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the biphosphonate pamidronate. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 138-140, 2002.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SADIJ, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p.1-21, 2002.
- SAMUELSON, J. Patologia Estrutural e Funcional. In: . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. **Doenças Infecciosas**, p. 350-351.
- SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa protease with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 129-137, 1997.
- SCHWARTZ, E.; HATZ, C. ; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 342-349, 2006.
- SEAMAN, J. et al. Liposomal amphotericin B (ambisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. **Clin. Infect.**, v. 21, n. 1, p. 188-193, 1995.
- SEGUNDO, B. S. Role of proteolytic enzymes in specific developmental processes in plants. Avilés F. X. **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 349-367,1993.
- SERENO, D. et al. Antimonial mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

- SHAW, M. K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 121, p. 35-47, 2000.
- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 2067-2075, 2004.
- SINGH, N.; SINGH, R.; SUNDAR, S. Novel mechanism of drug resistance in kala-azar field isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 4, p. 600-607, 2003.
- SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 331-344, 2006.
- SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of new world cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, n. 1, p. 34-40, 2006.
- SOUZA, G. F. et al. Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxid**, v. 15, n. 3, p. 209-216. 2006.
- SUNDAR, D. et al. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 3, p. 193-196, 2001.
- THAKUR, C. P. et al. *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 2, p. 187-189, 2001.
- TO, W-Y.; WANG, C. C. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**. v. 404, p. 253-262, 1997.
- URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91-S99, 1997.
- VIDAL-PUIG, A. J. et al. Ketoconazole therapy: hormonal and clinical effects in non-tumoral hyperandrogenism. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 130, n. 4, p. 333-338, 1994.
- VOHRINGER, H. F.; ARASTH, K. Pharmacokinetic optimization in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 24, n. 5, p. 388-412, 1993.
- MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic Activity of Some Xanthenes and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 369-372, 2006.
- ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 449-470, 1994.
- WALTON, B.C. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: . London: Academic Press, 1987. cap. **American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis**, p. 637-664.
- WHO. *In: Tropical Diseases. Progress in research, 1989-1990. Tenth Program report of the UNDP/World bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).* 79-87. WHO, Geneva, 1991.