

Ana Cláudia Francisco Garcia

DNA topoisomerasas em *Leishmania* sp.: potenciais alvos terapêuticos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Cláudia Francisco Garcia, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008011216, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 20 de Junho de 2014

(Ana Cláudia Francisco Garcia)

Professor Responsável

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa)

Aluna

(Ana Cláudia Francisco Garcia)

Agradecimentos

Gostaria de dirigir os meus agradecimentos à Professora Doutora Maria do Céu Sousa pela orientação na escolha e desenvolvimento do tema desta monografia e pela disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas. Um obrigado por toda a ajuda e colaboração!

Um agradecimento a todos os meus amigos, que estiveram sempre comigo, nos bons e maus momentos e que sempre me apoiaram nas minhas decisões. Sorte em ter-vos para a vida!

Por fim, um enorme obrigado à minha família. Sem eles nada disto seria possível!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	2
1. Resumo/abstract	3
2. Introdução	4
3. <i>Leishmania</i> sp.: o que é?	4
3.1. Ciclo de vida	6
3.2. Dados epidemiológicos	7
4. Moléculas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose	9
5. Potenciais alvos terapêuticos em <i>Leishmania</i> sp.	12
6. DNA topoisomerasas	14
6.1. Mecanismo de ação	14
6.2. Classificação das DNA topoisomerasas	15
6.3. DNA topoisomerasas em <i>Leishmania</i> sp.	16
6.3.1. DNA topoisomerasas tipo I	16
6.3.2. DNA topoisomerasas tipo II:	17
7. DNA topoisomerasas de <i>Leishmania</i> sp. como potencial alvo terapêutico	18
8. Inibidores das DNA topoisomerasas	19
8.1. Classificação dos inibidores das DNA topoisomerasas	20
8.2. Exemplos de inibidores das DNA topoisomerasas	21
9. Conclusão	22
10. Bibliografia	23

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

VL – leishmaniose visceral

CL – leishmaniose cutânea

kDNA – DNA do cinetoplasto

MCL – leishmaniose mucocutânea

PKDL – leishmaniose dérmica Pós-Kala-azar

IV – via intravenosa

IM – via intramuscular

Sb – antimônio pentavalente

HIV – vírus da imunodeficiência humana

FeSOD – Fe-superóxido-dismutase

T(SH)₂ – tripanotona

GSH – glutationa

TR – tripanotona redutase

GR – glutationa redutase

ROS – espécies reativas de oxigênio

DHBA – ácido di-hidrobetulínico

INF – γ – interferão – γ

TNF – α – fator de necrose tumoral – α

IL – 2 – interleucina 2

I. Resumo/abstract

Resumo

Leishmania sp. constitui um grupo de parasitas protozoários que são transmitidos entre hospedeiros mamíferos, incluindo o Homem, pela fêmea de flebótomos hematófagos. Este parasita provoca leishmaniose, um conjunto de manifestações clínicas que variam relativamente ao órgão afetado e à gravidade. A leishmaniose é uma das infeções tropicais mais negligenciada no que diz respeito ao desenvolvimento de novos fármacos, principalmente por se tratar de uma doença que afeta sobretudo as populações mais pobres dos países subdesenvolvidos.

A maioria dos fármacos usados no combate a esta doença tem elevada toxicidade e obriga à hospitalização do doente. Além disso, existe uma grande resistência parasitária às moléculas utilizadas.

A necessidade urgente de novos fármacos levou à procura de novas estratégias de combate à leishmaniose, com especial incidência na procura de novos alvos terapêuticos. Um importante e potencial alvo são as DNA topoisomerasas do parasita, enzimas ubíquas na natureza e cruciais para a sua sobrevivência. O facto de serem enzimas vitais para o parasita e de terem sido encontradas diferenças entre estas enzimas e as suas homólogas nos mamíferos, faz delas um excelente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Abstract

The protozoa of the genus *Leishmania* sp. are a diverse group of parasites which are transmitted between mammalian hosts by the female of blood-sucking sandflies. This parasite causes leishmaniasis, a range of clinical manifestations, which vary in relation to the organ affected and severity. Leishmaniasis is one of the most neglected tropical diseases in terms of drug discovery and development, mainly because it is a disease that mainly affects the poorest populations of developing countries.

Most antileishmanial drugs are highly toxic and require hospitalization of the patient. Furthermore, there is a high parasitic resistance to these molecules.

The urgent need for new drugs led to the search for new strategies to combat Leishmaniasis, with particular emphasis on the search for new therapeutic targets. Important potential targets are the parasite DNA topoisomerasas, enzymes ubiquitous in nature and crucial for their survival.

2. Introdução

A leishmaniose é um conjunto de manifestações clínicas causadas pelas várias espécies do parasita protozoário *Leishmania* sp.. Os parasitas são transmitidos entre mamíferos por fêmeas de flebótomos hematófagos através de ciclos antroponóticos ou zoonóticos¹.

Leishmania sp. tem um ciclo de vida dimórfico: promastigotas que se desenvolvem no intestino do vetor flebótomo são transmitidos por este aos hospedeiros mamíferos, onde se transformam em amastigotas. As principais manifestações clínicas da infecção por este parasita incluem a leishmaniose visceral (VL) e a leishmaniose cutânea (CL), podendo também ocorrer outras formas mais raras da doença¹.

O tratamento da leishmaniose recorre principalmente ao uso do antimônio pentavalente (Sb), anfotericina-B e paramomicina, mas o mecanismo de ação destes fármacos ainda não está completamente esclarecido. Além disso, a sua elevada toxicidade e efeitos secundários, e a elevada resistência parasitária evidenciam a urgência em descobrir novas moléculas e novos alvos terapêuticos².

Na última década surgiram várias pesquisas nesta área, que demonstraram a existência de potenciais alvos para o tratamento desta doença⁹, dos quais se destacam as DNA topoisomerasas, enzimas essenciais para a sobrevivência do parasita³. A descoberta de uma DNA topoisomerase tipo I invulgar nos parasitas da Ordem *Kinetoplastida* levou ao estudo desta enzima como um possível alvo para várias moléculas, direcionadas especificamente para o parasita. A DNA topoisomerase tipo II é crucial para a replicação do DNA do cinetoplasto (kDNA), tendo sido encontradas diferenças entre a enzima do parasita e a sua homóloga nos mamíferos, tornando-a também um alvo promissor³.

Estão já descritos vários inibidores das topoisomerasas, dos quais se destacam a camptotecina como inibidor da topoisomerase tipo IB³ e os derivados da acridina como inibidores da topoisomerase tipo II².

3. *Leishmania* sp.: o que é?

Leishmania sp. constitui um conjunto de parasitas pertencentes à Ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* (Fig.1), uma família de parasitas protozoários flagelados responsáveis por um conjunto de doenças infecciosas em humanos e animais⁴.

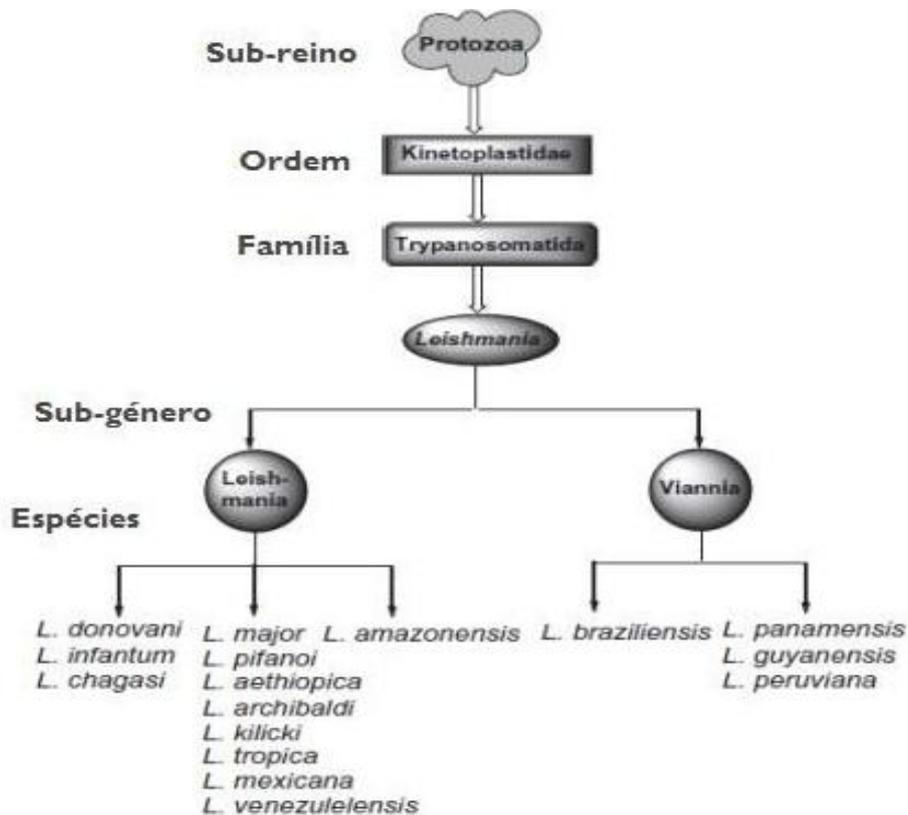


Figura 1 – Classificação taxonômica de *Leishmania* sp.. (Adaptado de Singh et al., 2014.)

As espécies de *Leishmania* sp. são zoonóticas e uma grande variedade de animais serve de reservatório deste parasita, incluindo cães (domésticos e selvagens), raposas, lobos, roedores, entre outros, sendo o cão o reservatório principal^{5,6}.

Leishmania sp. é um parasita unicelular, intracelular obrigatório, que existe em duas formas morfológicas distintas: promastigotas (Fig.2) e amastigotas (Fig.3). A forma promastigota caracteriza-se por ser uma célula fusiforme e alongada, com um único flagelo que se localiza anteriormente a um organelo citoplasmático denominado cinetoplasto. Cinetoplasto é o nome dado à única mitocôndria existente nestas células⁴ e é um organelo que contém moléculas de DNA circular de dupla cadeia, estrutural e metabolicamente incomum, designado DNA do cinetoplasto (kDNA). Este DNA representa cerca de 30% do DNA total do parasita e consiste em pequenos círculos de dupla cadeia, que têm diferentes tamanhos, sendo assim designados de mini- ou maxicírculos⁴. Cerca de 90% deste DNA é formado por minicírculos². Os promastigotas são móveis e são a forma infetante do parasita. A forma amastigota, forma não-infetante, caracteriza-se por ser uma célula arredondada ou

oval, imóvel, que se desenvolve nos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares ou nas células endoteliais do Homem e animais vertebrados⁷.



Figura 2 – Promastigotas de *Leishmania donovani*⁶.

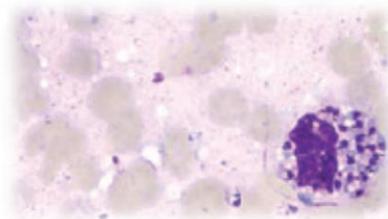


Figura 3 – Amastigotas de *Leishmania* sp. no interior de macrófagos⁶.

O parasita é transmitido por vetores que pertencem à Classe *Insecta* e à Sub-família *Phlebotomidae*, designados flebótomos. No Novo Mundo (América Central e América do Sul), este vetor pertence ao Género *Lutzomyia*, enquanto no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) pertence ao Género *Phlebotomus*. É de salientar que apenas as fêmeas deste inseto são hematófagas, logo apenas as fêmeas são vetores da doença¹².

3.1. Ciclo de vida

Leishmania sp. apresenta um ciclo de vida dimórfico (Fig.4): os promastigotas, que habitam no intestino do vetor, entram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante a picada do inseto e diferenciam-se em amastigotas, que se vão multiplicar dentro das células hospedeiras até ocorrer a sua lise¹⁰.

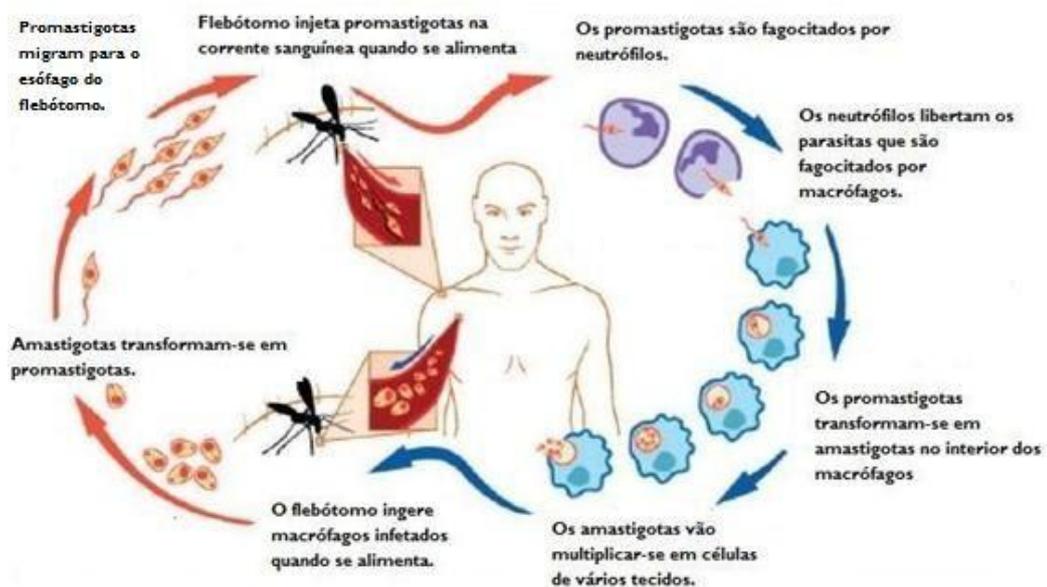


Figura 4 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp.. (Adaptado de: Mcgwire et al., 2014.)

A infecção inicia-se quando o flebótomo fêmea infetado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado⁶. Uma vez na corrente sanguínea deste hospedeiro, os promastigotas são fagocitados por células fagocitárias mononucleares⁷. Os promastigotas fagocitados alojam-se em vacúolos parasitóforos que se fundem com lisossomas para formar fagolisossomas, onde se transformam e replicam em amastigotas. A carga parasitária, ao aumentar, perturba fisicamente as células infetadas, que sofrem lise⁶. Ao ocorrer lise da célula hospedeira, os amastigotas ficam livres e propagam-se para outras células e tecidos, incluindo baço, fígado e medula óssea⁷.

Os amastigotas, que se encontram livres na corrente sanguínea ou no interior dos macrófagos, são ingeridos quando a fêmea do mosquito se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infetado. Uma vez ingeridos pelo flebótomo, os amastigotas migram para o intestino deste e transformam-se em promastigotas. Após um período de 4 a 5 dias, os promastigotas deslocam-se para o esófago do mosquito. Ao alimentar-se de novo, o flebótomo infetado regurgita os promastigotas infecciosos, que entram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e o ciclo de vida repete-se⁷.

3.2. Dados epidemiológicos

Leishmania sp. está distribuída por muitos países tropicais e de clima temperado, com uma prevalência global de 12 milhões de pessoas infetadas, estimando-se que surjam cerca de 2 milhões de novos casos de leishmaniose a cada ano que passa, dos quais 1,5 milhões são casos de CL e 0,5 milhões são casos de VL⁷. A leishmaniose é um conjunto de manifestações clínicas com uma grande diversidade epidemiológica e clínica, causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* sp.⁸. Trata-se de um grupo de doenças viscerais e cutâneas associadas, na maioria dos casos, à pobreza⁹.

A leishmaniose é prevalente em 88 países de 5 continentes – África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul. Estes números refletem os casos reportados, mas existe uma grande subnotificação em áreas endêmicas, o que oculta a verdadeira severidade desta doença¹⁰.

As epidemias de leishmaniose ocorrem quando as pessoas se deslocam para regiões endêmicas (devido a guerras ou migração) ou quando as populações que habitam nestas regiões sofrem de doença ou malnutrição graves. Calcula-se que existam cerca de 350 milhões de pessoas a viver em risco de infecção por *Leishmania* sp.⁷.

A infecção do ser humano por espécies patogênicas de *Leishmania* sp. causa diversas infecções crônicas⁶ e são muitos os fatores que podem levar ao aumento dos casos de leishmaniose, nomeadamente a epidemia do HIV, o aumento das viagens intercontinentais, os conflitos internacionais, a dificuldade no controlo dos vetores, a falta de uma vacina efetiva e o desenvolvimento de resistência à terapia atualmente existente¹⁰.

Dependendo de vários fatores, nomeadamente a espécie infetante, o hospedeiro, o vetor e o ambiente, a doença pode manifestar-se de diferentes formas, variando a parte do corpo afetada⁶:

a) Leishmaniose cutânea (CL)

A CL é a forma menos grave da doença e pode ser causada por várias espécies de *Leishmania* sp., tais como *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* em várias regiões da América Central e do Sul⁶.

A CL simples manifesta-se por lesões singulares ulcerativas ou nodulares, que se restringem ao local da picada pelo vetor flebótomo. Estas lesões são encontradas, normalmente, em áreas descobertas do corpo como face, antebraços e pernas e evoluem durante semanas a meses, apresentando na maioria dos casos cura espontânea em 3-18 meses⁶.

A CL difusa, como por exemplo a que é causada por *Leishmania amazonensis*, caracteriza-se por lesões nodulares de tamanho variável que podem ser encontradas em várias regiões do corpo, muitas vezes distantes do local da picada do inseto. Esta forma de CL pode ter uma evolução mortal⁶.

b) Leishmaniose mucocutânea (MCL)

A MCL é causada exclusivamente por *Leishmania braziliensis*, sendo a maioria dos casos encontrados em países da América do Sul. Pode dever-se à disseminação hematogénica ou linfática do parasita ou à extensão das lesões cutâneas de CL para o tecido mucocutâneo. Tem uma evolução crónica e podem ocorrer recidivas frequentes após o tratamento das lesões primárias. É uma infecção extremamente desfigurante, com invasão da mucosa oral e nasal e destruição da cartilagem do nariz, palato e face, afetando a função respiratória e dificultando o processo de alimentação⁶.

Esta doença é geralmente refratária à quimioterapia e os doentes morrem, muitas vezes, de infeções secundárias e desnutrição⁶.

c) Leishmaniose visceral (VL)

A VL, também conhecida como *Kala-azar*, resulta da infecção das vísceras do hospedeiro pelo parasita, localizando-se preferencialmente no sistema macrofágico do baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides, sendo fatal se não for tratada⁶.

No Velho Mundo, a VL é causada por *Leishmania donovani* (Índia, Paquistão, China e África) e *Leishmania infantum* (bacia mediterrânica). No Novo Mundo, é causada por *Leishmania chagasi*, que se encontra principalmente no Brasil. Existem também relatos da incidência de VL no Médio Oriente, causada por cepas viscerotrópicas de *Leishmania tropica*, que é considerada um agente de CL⁶.

A proliferação do parasita nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea provoca hepatoesplenomegalia progressiva e supressão da medula óssea. Se não forem sujeitos a tratamento, os doentes podem desenvolver pancitopenia e imunossupressão, ficando propensos a infeções por outros microrganismos, acabando por sucumbir à doença⁶.

Os indivíduos co-infetados com HIV, devido à imunossupressão severa que os dois agentes causam, têm uma suscetibilidade especial para o desenvolvimento de apresentações atípicas da doença, com aumento da severidade desta⁶.

d) Leishmaniose dérmica Pós-Kala-azar (PKDL)

A PKDL afeta um subgrupo de doentes tratados com sucesso para VL, que permanecem assintomáticos durante meses a anos e que desenvolvem uma proliferação fulminante de parasitas no interior da pele, originando lesões maculares difusas, lesões maculo-papulares e lesões nodulares. Tem grande incidência na Índia e Sudão em pacientes infetados por *Leishmania donovani*⁶.

A patogénese da PKDL ainda não está totalmente esclarecida, mas parece relacionar-se com uma resposta imune agressiva contra os parasitas, mediada pelo interferão- γ (INF- γ)⁶.

4. Moléculas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose

A leishmaniose afeta sobretudo as populações mais pobres dos países subdesenvolvidos, suscitando por isso pouco interesse a investigadores, indústrias farmacêuticas e agências de financiamento para estudo e desenvolvimento de novos fármacos para tratamento desta doença¹⁰. Existe já um número significativo de fármacos usados no tratamento das diversas formas de leishmaniose, variando a sua escolha de acordo com a forma como a doença se manifesta⁶.

O Sb foi considerado o fármaco de primeira linha durante várias décadas. No entanto, apresenta vários efeitos tóxicos e a sua ineficácia tem vindo a aumentar devido ao

desenvolvimento de resistência parasitária. O mecanismo de ação deste fármaco ainda não está completamente esclarecido, mas acredita-se ser um mecanismo multifatorial, que atua diretamente em alguns processos moleculares vitais do parasita e, em simultâneo, influencia a atividade parasiticida dos macrófagos. Este composto pode ser administrado por via intravenosa (IV), por via intramuscular (IM) e, no caso da CL, pode ser também utilizado diretamente nas lesões. Em alguns casos, a terapia sistêmica é feita em combinação com outros agentes, para aumentar a eficácia do tratamento. O Sb pode ser utilizado em combinação com a paramomicina no tratamento de VL no Leste de África e de CL causada por *Leishmania aethiopica* e em combinação com a pentoxifilina, um inibidor de TNF- α , no tratamento de CL causada por *Leishmania major*. Apesar dos benefícios evidentes, o Sb apresenta diversos efeitos secundários, dos quais o mais grave é a cardiotoxicidade, pelo que o tratamento requer um acompanhamento atento dos doentes⁶.

Além deste, existem outros agentes alternativos que são utilizados de acordo com a disponibilidade e eficácia nas diferentes regiões endêmicas⁶:

a) Anfotericina-B

A anfotericina-B é um leishmanicida eficaz, que atua por ligação ao ergosterol da membrana do parasita, causando instabilidade desta membrana e levando à morte do parasita⁶.

Este fármaco tem sido utilizado no tratamento da leishmaniose sob a forma de desoxicolato ou formulado em lipossomas. O desoxicolato é utilizado no tratamento de várias formas da doença mas a formulação lipossomal permite reduzir a duração do tratamento. A anfotericina lipossomal pode ser utilizada em combinação com outros fármacos: uma dose única de anfotericina lipossomal em combinação com miltefosina ou paramomicina demonstrou ser mais eficaz do que cada um dos fármacos sozinho⁶.

A anfotericina-B apresenta também efeitos secundários, sendo os mais comuns insuficiência renal e distúrbios eletrolíticos. Estes efeitos são menos habituais com a forma lipossomal. No entanto, o facto de esta formulação ser bastante mais cara do que a forma não lipossomal torna a sua utilização muito limitada⁶.

b) Paramomicina

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que bloqueia a síntese de proteínas ao ligar-se à subunidade 16S do ribossoma. É utilizado por via IM no tratamento de VL na Índia, sendo também utilizado topicamente para tratamento de CL, numa formulação que combina paramomicina com cloreto de metilo. Recentemente, a paramomicina tópica, em associação

ou não com a gentamicina, demonstrou eficácia na resolução rápida de lesões causadas por *Leishmania major*⁶.

Os principais efeitos secundários da utilização sistêmica da paramomicina são ototoxicidade e nefrotoxicidade⁶.

c) Pentamidina

O mecanismo de ação da pentamidina ainda não está totalmente entendido, mas sabe-se que interfere com a biossíntese de macromoléculas como o DNA, RNA, fosfolípidos e proteínas. É utilizada por via IV para tratamento de CL na América do Sul, causada por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*, existindo alguns estudos que demonstram a sua eficácia em CL do Velho Mundo causada por *Leishmania tropica* e *Leishmania major* bem como nas lesões cutâneas causadas por *Leishmania infantum*⁶.

Existe um grande número de reações adversas associadas à utilização deste fármaco, sendo as mais notáveis hipoglicémia e/ou agravamento da diabetes, alteração das enzimas hepáticas, efeitos na medula óssea, tais como leucopenia e anemia, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade⁶.

d) Miltefosina

A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como agente antineoplásico, sendo mais tarde descoberta a sua ação no tratamento da leishmaniose. Este fármaco pode ser utilizado em adultos e crianças, sendo a dose calculada em função do peso corporal. É a única molécula utilizada por via oral no tratamento de VL na Índia e Leste de África, sendo também eficaz no tratamento de CL do Novo Mundo causada por *Leishmania mexicana*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*. É um fármaco muito bem tolerado e os principais efeitos adversos são náuseas e vômitos. No entanto, é um agente teratogénico, logo é contraindicado na gravidez⁶.

e) Imiquimod

O imiquimod é uma quinolona imidazólica tópica que induz a ativação dos macrófagos através da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2, IFN- γ e TNF- α . É utilizado em associação com o Sb no tratamento de recaídas de CL no Novo Mundo. Geralmente é bem tolerado, sendo o seu principal efeito adverso irritação no local de aplicação⁶.

f) Azóis

O cetoconazol e o fluconazol são utilizados para acelerar a cicatrização das lesões de CL causada por *Leishmania mexicana* e *Leishmania major*, respetivamente. Os doentes que fazem terapia azólica a longo prazo requerem exames de sangue de rotina para verificar se existem anormalidades da função hepática⁶.

g) Crioterapia

A aplicação de azoto líquido diretamente nas lesões de CL é utilizada no tratamento da CL do Velho Mundo causada por *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania infantum*. É também utilizada em combinação com o Sb, aplicados diretamente nas lesões, no tratamento de CL causada por *Leishmania major*⁶.

h) Terapia por calor

O aquecimento das lesões cutâneas até 50° C por 30 segundos pode ser utilizado para acelerar a resolução de lesões de CL do Velho e do Novo Mundo, sendo esta técnica comparável em eficácia à terapia intralesional ou sistémica com Sb. Este método também é eficaz em doentes com CL infetados com o vírus HIV que não respondem ao tratamento com Sb⁶.

A terapêutica atual da leishmaniose apresenta diversos problemas, como a falta de fármacos seguros e eficazes e a elevada resistência parasitária, sendo este último extremamente preocupante. O Sb permanece na base do tratamento, mas a crescente resistência a este fármaco em algumas regiões está a torná-lo obsoleto. Surge assim a necessidade urgente de novas terapias¹⁰.

5. Potenciais alvos terapêuticos em *Leishmania* sp.

A leishmaniose é a única infeção tropical tratada por fármacos não específicos para a doença. Além disso, o mecanismo de ação exato destes fármacos ainda não é completamente conhecido. Publicações recentes mostram que os estudos atuais se focam apenas em ensaios e possíveis combinações de fármacos já existentes, estando a ser dada pouca importância aos aspetos biológicos da doença. Consequentemente, está a ser dada pouca ênfase a novas possibilidades de controlo da doença, como novos alvos terapêuticos e novas vacinas⁸.

Ao longo das últimas duas décadas, houve um progresso notável em várias áreas de conhecimento de *Leishmania* sp. e da leishmaniose, mas infelizmente, a identificação de novos alvos terapêuticos e de novos fármacos está longe de ser satisfatória⁸.

A procura de novos alvos deve focar-se essencialmente nas vias metabólicas e bioquímicas essenciais para a sobrevivência do parasita. As enzimas alvo destas vias devem ter uma diferença significativa a nível estrutural e funcional em relação a estas mesmas enzimas existentes nos mamíferos, para que exista uma inibição seletiva apenas no parasita. A utilização de mais do que uma enzima de uma mesma via metabólica pode ser uma estratégia útil e eficaz⁸.

Várias vias metabólicas e respetivas enzimas, existentes em *Leishmania* sp., podem ser utilizadas como possíveis alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos⁸.

a) Enzimas da via de biossíntese das poliaminas

As poliaminas putresceína, espermidina e espermina, além de diminuírem a peroxidação lipídica provocada pelos compostos oxidantes, tornando o ambiente favorável à sobrevivência do parasita, têm um papel importante no crescimento e diferenciação do parasita da fase de promastigota para a fase de amastigota.

A arginina é convertida em L-ornitina pela enzima arginase; a L-ornitina é convertida em putresceína pela enzima ornitina descarboxilase, que posteriormente é transformada em espermidina e espermina. Uma boa estratégia para o tratamento da leishmaniose é utilizar a enzima arginase como alvo, pois sendo a enzima inicial do metabolismo das poliaminas, pode revelar-se muito útil⁸.

b) Enzimas glicossomais

Em *Leishmania* sp. são encontrados organelos semelhantes ao peroxissomas, designados de glicossomas. Estes organelos têm um papel importante a nível de várias vias metabólicas como a glicólise, oxidação dos ácidos gordos, biossíntese lipídica, entre outras. Como resultado destas vias metabólicas, são formados em grande quantidade radicais superóxido. Para proteger as enzimas glicossomais da toxicidade dos radicais superóxido, existe uma enzima em *Leishmania* sp., designada de Fe-superóxido dismutase (FeSOD), responsável pela proteção dos glicossomas da atividade letal dos radicais superóxido. É importante ainda referir que a FeSOD não existe nos mamíferos, o que faz desta enzima uma ótima possibilidade de alvo terapêutico nestes parasitas⁸.

c) Enzimas envolvidas no metabolismo do tiol

Leishmania sp. sobrevive e prolifera no interior dos macrófagos do hospedeiro mamífero, escapando às espécies reativas de oxigênio e às espécies reativas de nitrogênio que são produzidas pelo hospedeiro como mecanismos imunes.

Estes parasitas possuem tripanotona ($T(SH)_2$) em vez de glutatona (GSH), como redutor principal e substituem o complexo redutor GSH/glutatona redutase (GR) pelo seu sistema $T(SH)_2$ /tripanotona redutase (TR). Este complexo tem uma maior capacidade de neutralizar o óxido nítrico, protegendo os parasitas da ação letal deste composto. Este pode ser um alvo para o desenvolvimento de fármacos seletivos⁸.

d) Enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol

Nas espécies de *Leishmania* sp., os esteróis endógenos majoritários são o ergosterol e o estigmaesterol, que são diferentes do colesterol encontrado nos mamíferos. Assim sendo, estes esteróis podem ser usados como um possível alvo terapêutico para tratamento da leishmaniose.

A anfotericina tem como mecanismo de ação causar instabilidade ao nível do ergosterol da membrana do parasita, mas devido à grande resistência a este fármaco, é urgente o desenvolvimento de novas moléculas que atuem inibindo as enzimas envolvidas na biossíntese dos esteróis⁸.

e) DNA topoisomerasas

As DNA topoisomerasas são enzimas necessárias para remover o stress torsional do DNA. Estas enzimas têm um longo historial de utilização como alvos no tratamento do cancro e infeções bacterianas. São também essenciais para a sobrevivência de *Leishmania* sp., o que as torna um potencial alvo a ser estudado no tratamento da leishmaniose⁸.

6. DNA topoisomerasas

6.1. Mecanismo de ação

A estrutura helicoidal de dupla cadeia da molécula de DNA apresenta alterações topológicas ao longo dos processos de replicação, transcrição, recombinação e reparação¹². As DNA topoisomerasas têm um papel crucial nestas alterações¹², sendo fundamentais na modulação das estruturas dinâmicas do DNA, executando assim funções vitais na célula².

Trata-se de uma família de enzimas que têm como função libertar a tensão torsional do DNA, catalisando a clivagem e posterior recombinação destas cadeias¹³. Estas enzimas fazem o corte, a manipulação e a reunião das cadeias de DNA para modular a sua topologia¹¹. Este

processo envolve o corte de uma cadeia (ou ambas as cadeias), permitindo que a extremidade livre (ou extremidades) rode em torno do eixo da hélice e seque a quebra¹¹. A clivagem ocorre por reação de transesterificação que envolve o ataque nucleófilo de um grupo hidroxilo da tirosina do sítio ativo da enzima a uma ligação fosfodiéster do DNA, formando-se uma ligação covalente fosfotirosil entre a enzima e o DNA que dá origem ao complexo intermediário enzima-DNA¹². Resumindo, o mecanismo de ação destas enzimas pode ser descrito em três passos gerais:

1. Ligação da enzima (DNA topoisomerase) ao substrato (DNA);
2. Clivagem do DNA acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transitória entre um resíduo de tirosina da proteína e uma das terminações da cadeia cortada, com subsequente passagem de outra cadeia através do corte, o que leva à alteração do número de ligações;
3. Religação das cadeias e libertação da enzima¹¹.

6.2. Classificação das DNA topoisomerasas

As DNA topoisomerasas classificam-se, de um modo geral, em dois tipos, de acordo com a forma como clivam o DNA: DNA topoisomerasas tipo I e DNA topoisomerasas tipo II.

As DNA topoisomerasas tipo I fazem um corte transitório numa das cadeias de DNA, passam a cadeia intacta através do corte e ligam as extremidades cortadas, alterando o número de ligações em múltiplos de um¹¹.

As DNA topoisomerasas tipo II clivam transitoriamente ambas as cadeias de DNA, passando outra dupla cadeia de DNA, que pode pertencer à mesma molécula ou a outra molécula, através deste corte, alterando o número de ligações em múltiplos de dois. Ao contrário das DNA topoisomerasas tipo I, as DNA topoisomerasas tipo II são ATP-dependentes¹¹.

As DNA topoisomerasas podem também ser classificadas em três subfamílias independentes: tipo IA, tipo IB e tipo II, cujos membros representativos estão descritos na Tabela I. Dentro da subfamília IA, podem incluir-se a topoisomerase I de *Escherichia coli*, a topoisomerase III de *Saccharomyces cerevisiae* e a girase reversa. Esta subfamília é também designada de I-5', porque a ligação da enzima é feita a um fosfato 5' no DNA. O protótipo do tipo IB ou I-3' pode ser encontrado em todos os eucariotas e também na DNA topoisomerase I do vírus *vaccinia*, sendo a ligação da enzima ao DNA feita através de um

fosfato 3'. Embora sejam muito semelhantes, estas duas subfamílias apresentam algumas diferenças na preferência pelo substrato, na necessidade de cofator e na composição¹¹.

A subfamília tipo II inclui a DNA girase e a topoisomerase IV de *Escherichia coli* e a arcaica topoisomerase tipo VI. Tal como as topoisomerases tipo IA, as topoisomerases tipo II ligam-se a um fosfato 5' no DNA¹¹.

Tabela I – Classificação das DNA topoisomerases tipos I e II de diferentes espécies. (Adaptado de Das et al., 2006.)

Subfamília	Membros representativos
IA	DNA topoisomerases I e II bacterianas DNA topoisomerase III das leveduras DNA topoisomerase III α e III β de <i>Drosophila</i> DNA topoisomerase III α e III β de mamíferos
IB	Topoisomerase I monomérica eucariota DNA topoisomerase I mitocondrial de mamíferos DNA topoisomerase I dimérica da Ordem Kinetoplastida Topoisomerase I do Pox virus
II	Girase bacteriana DNA topoisomerase IV DNA topoisomerase do fago T4 DNA topoisomerase II de leveduras DNA topoisomerase II de <i>Drosophila</i> DNA topoisomerases II α e II β de mamíferos DNA topoisomerase VI de <i>Sulfolobus shibate</i>

6.3. DNA topoisomerases em *Leishmania* sp.

As DNA topoisomerases de *Leishmania* sp. representam uma família de enzimas que modulam a topologia da molécula de DNA, não apenas do DNA nuclear mas também do kDNA¹⁴.

6.3.1. DNA topoisomerases tipo I

A sequência de DNA do gene que codifica a topoisomerase tipo I da Ordem *Kinetoplastida* foi descrita pela primeira vez em 1999¹¹. A diferente sensibilidade desta enzima para alguns fármacos em comparação com as suas homólogas nos mamíferos levou ao estudo da sequência genética que codifica a enzima, levando à descoberta de uma topoisomerase tipo IB única existente nestes parasitas³.

A topoisomerase tipo IB de todos os eucariotas é uma enzima monomérica e consiste em 4 domínios (Fig.5): o domínio amino-terminal, importante para a localização nuclear da enzima; o domínio nuclear, essencial para a atividade enzimática; o domínio *linker*, que liga o núcleo ao domínio catalítico; o domínio carboxi-terminal, que alberga a tirosina catalítica³.

Desde as bactérias até aos humanos, as topoisomerases tipo I são codificadas por um único gene que contém o domínio de ligação ao DNA e o domínio catalítico, sendo enzimas monoméricas. Ao contrário das restantes topoisomerases tipo IB, as topoisomerases tipo IB da Ordem *Kinetoplastida* possuem uma estrutura heterodimérica (Fig.6). Esta estrutura consiste em uma subunidade grande de 635 aminoácidos, codificada pelo gene LdTOPIL localizado no cromossoma 34 e uma subunidade pequena de 262 aminoácidos, codificada por sua vez por um gene que se designa por LdTOPIS localizado no cromossoma 4. Estes genes foram identificados através da sequenciação genética de *Leishmania donovani*¹¹. A ligação entre a subunidade grande, que contém o domínio de ligação ao DNA e a subunidade pequena, que contém o sítio ativo da enzima, ocorre através de uma interação proteína-proteína¹³.



Figura 5 – Representação esquemática do domínio de organização da DNA topoisomerase I monomérica humana. (Adaptado de Das et al., 2006.)

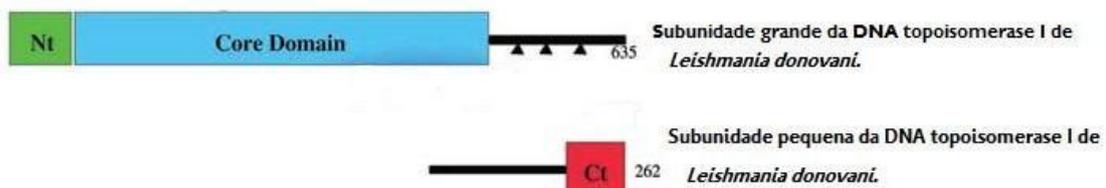


Figura 6 – Representação esquemática do domínio de organização da topoisomerase I heterodimérica de *Leishmania donovani*. (Adaptado de Das et al., 2006.)

6.3.2. DNA topoisomerases tipo II:

As DNA topoisomerases tipo II foram purificadas de vários parasitas da Ordem *Kinetoplastida*, incluindo *Leishmania* sp.. Estas enzimas são de menor tamanho quando comparadas com as topoisomerases tipo II dos restantes eucariotas, tal como os genes que as codificam.

O interesse na topoisomerase tipo II destes parasitas advém do facto de serem enzimas chave na replicação do DNA do cinetoplasto. Estas enzimas são constituídas por uma ATPase N-terminal, um domínio de ligação ao DNA e um domínio C-terminal, que contém uma sequência de 60 aminoácidos que não está presente na topoisomerase tipo II dos restantes eucariotas³.

Como já foi referido anteriormente, estes parasitas possuem uma única mitocôndria, designada de cinetoplasto, ao contrário dos restantes eucariotas, que possuem centenas ou mesmo milhares de mitocôndrias. Por isso, esta única mitocôndria é vital para o parasita. Uma percentagem pequena mas essencial das proteínas do parasita é codificada e produzida no cinetoplasto⁴. Durante a replicação do kDNA, o conteúdo de DNA do cinetoplasto da célula progenitora duplica, sendo este conteúdo dividido pelas duas células filhas. Há uma duplicação do número de minicírculos e maxicírculos que são distribuídos por duas células genética e topologicamente idênticas. A replicação do kDNA ocorre quase em sincronia com a síntese nuclear, ao contrário do DNA mitocondrial de outras espécies, cuja replicação ocorre ao longo do ciclo celular. As DNA topoisomerasas tipo II, sendo as topoisomerasas maioritárias neste organelo, desempenham um papel fundamental nesta replicação e consequentemente, na sobrevivência do parasita².

7. DNA topoisomerasas de *Leishmania* sp. como potencial alvo terapêutico

Como já foi referido, as DNA topoisomerasas desempenham papéis fundamentais nos processos celulares, afetando a topologia e a organização do DNA, sendo portanto importante definir as suas funções fisiológicas e compreender a base molecular da sua ação. Além da sua função na atividade celular normal, estas enzimas são um alvo terapêutico comprovado para muitos fármacos anti-tumorais e antimicrobianos. Neste contexto, torna-se crucial estudar as topoisomerasas de *Leishmania* sp. e desenvolver novos fármacos que tenham como alvo estas enzimas¹¹.

Em condições normais, os complexos DNA topoisomerase-DNA são intermediários catalíticos fugazes e estão presentes em concentrações baixas e estáveis. No entanto, condições que levem ao aumento ou à diminuição da concentração fisiológica destes complexos podem desencadear um conjunto de efeitos deletérios (mutações, inserções, deleções e aberrações cromossómicas). Assim sendo, pode dizer-se que as DNA topoisomerasas são dualistas na natureza: por um lado catalisam reações celulares essenciais, mas por outro possuem um lado negro inerente capaz de provocar grandes danos no

genoma de um organismo vivo. Posto isto, as DNA topoisomerasas são cada vez mais reconhecidas como potenciais alvos quimioterapêuticos para agentes antiparasitários¹¹.

A DNA topoisomerase tipo IB purificada de *Leishmania donovani* é distinta das suas homólogas presentes nos restantes eucariotas no que diz respeito às suas propriedades biológicas, à sua estrutura mas principalmente na sua sensibilidade preferencial para muitos agentes terapêuticos. Este facto faz desta enzima um elemento importante no desenvolvimento de novos compostos para o tratamento da leishmaniose². Uma outra característica da DNA topoisomerase tipo IB destes parasitas é a necessidade de uma interação entre as duas subunidades para a formação da enzima, característica essa, que não sendo comum à enzima dos mamíferos pode ser explorada como alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos seletivos¹¹.

A DNA topoisomerase tipo II de *Leishmania* sp. localiza-se no núcleo, mas também no cinetoplasto. Embora as topoisomerasas tipo II sejam altamente conservadas entre diferentes espécies eucariotas, a diferente sensibilidade da enzima do parasita aos fármacos deve ser explorada no desenvolvimento de novas moléculas³. Uma característica já referenciada anteriormente e que deve ser tida em conta para o estudo desta como potencial alvo é a sequência de 60 aminoácidos do C-terminal da enzima, que não existe nas suas homólogas. Além disso, a enzima do parasita demonstrou maior afinidade para o DNA, sendo este facto consistente com a maior suscetibilidade da enzima do parasita para os agentes anti-topoisomerase II. Isto deve-se ao facto de uma enzima com mais afinidade para o DNA catalisar mais clivagem, existindo assim maior probabilidade de um fármaco estabilizar o complexo enzima-DNA¹¹.

Diversos estudos demonstraram que as DNA topoisomerasas de *Leishmania* sp. são suficientemente distintas das suas homólogas existentes nos mamíferos de modo a permitir que os fármacos utilizados para inibir estas enzimas atuem no parasita sem prejudicar o hospedeiro, tornando-as ótimos alvos moleculares².

8. Inibidores das DNA topoisomerasas

A terapia medicamentosa de infeções por *Leishmania* sp. tem vindo a tornar-se uma necessidade e a utilização de inibidores das DNA topoisomerasas na terapêutica da leishmaniose demonstra ter um grande interesse.

8.1. Classificação dos inibidores das DNA topoisomerasas

Os inibidores das DNA topoisomerasas podem ser classificados em duas classes: inibidores de classe I e inibidores de classe II². O mecanismo de ação de cada uma das classes está representado na Fig. 7.

Os inibidores de classe I estabilizam a ligação covalente que se forma entre a enzima e o DNA e são genericamente conhecidos como “venenos das topoisomerasas”¹³.

A estabilização dos complexos de clivagem pelos inibidores de classe I leva posteriormente à morte celular, através de um processo complexo que inclui o início dos danos, seguido de alterações no ciclo celular e por fim o acoplamento da maquinaria enzimática da célula, resultando em apoptose. A morte celular programada após o tratamento com estes agentes deve-se à ativação de quinases induzidas pelo stress e ativação de caspases, que resulta em clivagens mediadas por estas enzimas².

Os inibidores de classe II apenas têm capacidade de anular a propriedade catalítica da enzima, interferindo com a formação da ligação covalente DNA topoisomerase-DNA¹⁴. Estes agentes de classe II interferem com as funções catalíticas da enzima, sem estabilização dos complexos de clivagem e são geralmente conhecidos como “inibidores catalíticos”². Todos os agentes de classe II atuam por um de dois mecanismos:

1. Ligam-se à enzima impedindo-a de se ligar ao DNA;
2. Ligam-se ao DNA, tornando-o inacessível para a enzima².

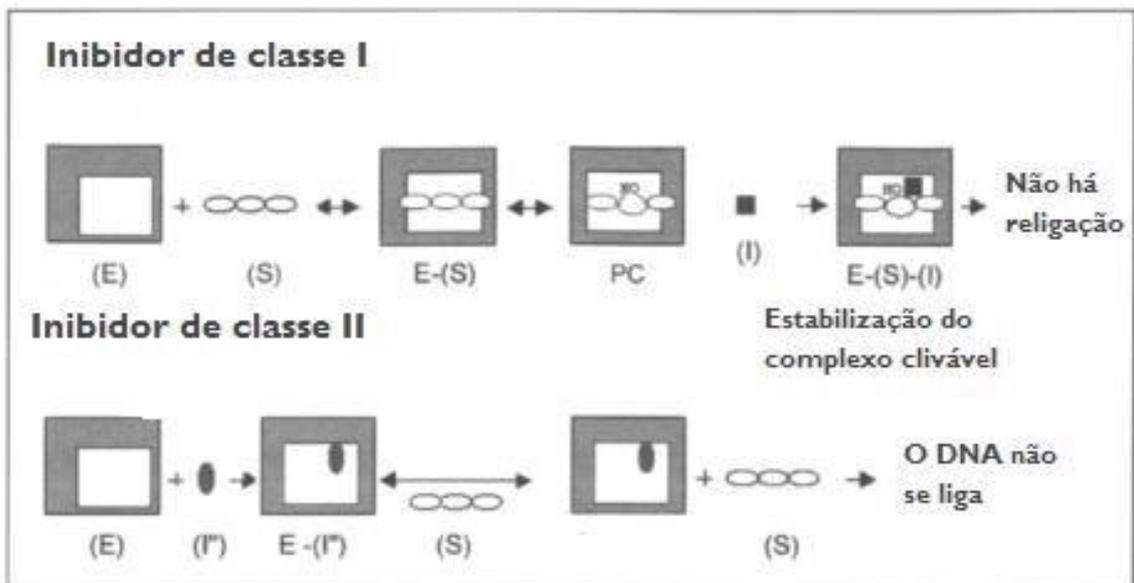


Figura 7 – Classificação dos inibidores das DNA topoisomerasas. (Adaptado de Das et al., 2006.)

8.2. Exemplos de inibidores das DNA topoisomerasas

- Camptotecina

A camptotecina é um alcaloide extraído da planta *Camptotheca acuminata* e é o mais bem caracterizado inibidor da DNA topoisomerase tipo IB. Trata-se de um inibidor de classe I não competitivo que se liga ao complexo covalente enzima-DNA e impede a religação das cadeias de DNA³. Este agente demonstrou induzir morte celular programada tanto em amastigotas como em promastigotas de *Leishmania donovani*. As células do parasita demonstraram ser mais sensíveis ao fármaco em relação às células dos mamíferos. A disfunção celular induzida pela camptotecina envolve muitos aspetos citoplasmáticos e nucleares. Durante a fase inicial de ativação, há um aumento das espécies reativas de oxigénio (ROS) no interior das células, que provoca a elevação no nível de peroxidação lipídica e a diminuição dos equivalentes redutores. A formação endógena de ROS e a peroxidação lipídica causam a perda do potencial de membrana mitocondrial. Estes eventos são seguidos da ativação de proteases que levam à morte celular programada do parasita².

- Diospirina

A diospirina, uma quinolona isolada da planta *Diospyros montana*, demonstrou ser um inibidor de classe II, que inibe a atividade catalítica da topoisomerase tipo I de *Leishmania donovani*, prevenindo a formação do complexo enzima-DNA².

- 9-anilinoacridina

A 9-anilinoacridina é um dos compostos com atividade leishmanicida (inibidor de classe I) mais recentes e, tal como outros derivados da acridina, atua por envenenamento da topoisomerase tipo II. Estes compostos demonstraram estabilizar os complexos cliváveis enzima-DNA tanto no núcleo como no cinetoplasto; no entanto, exibiram também citotoxicidade contra a topoisomerase tipo II dos mamíferos, não sendo estes compostos agentes seletivos².

- Flavonoides

Alguns flavonoides, como a quercetina e a luteolina demonstraram inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, induzindo a paragem do ciclo celular e provocando apoptose (inibidor de classe I)².

- Ácido betulínico

O ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico com um amplo espectro de propriedades farmacológicas demonstrou ser um potente inibidor das DNA topoisomerasas I e II. Mais recentemente, foi também demonstrado que o ácido di-hidrobetulínico (DHBA), um derivado do ácido betulínico, é um excelente inibidor da DNA topoisomerase tipo I de *Leishmania* sp., com potencial para se tornar um composto terapêutico de 1ª linha. O DHBA é um inibidor de classe I que induz apoptose, sendo seletivo para as topoisomerasas do parasita².

- Nirantina

Um outro composto que está atualmente a ser estudado como inibidor das DNA topoisomerasas de *Leishmania* sp. é a nirantina. A nirantina é um lignano isolado das partes aéreas da planta *Phyllanthus amarus* que exibe um largo espectro de atividades farmacológicas e demonstrou ser um potente agente anti-*Leishmania*. Este composto é um inibidor de classe I, que induz a formação do complexo DNA topoisomerase I-DNA nas células de *Leishmania* sp. e estabiliza este complexo, o que inibe a religação da cadeia de DNA clivada¹⁵.

9. Conclusão

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial, com uma prevalência enorme, que necessita de ser controlado. Apesar de o conhecimento acerca de *Leishmania* sp. ter evoluído significativamente nos últimos anos, o desenvolvimento de novas moléculas para tratamento da leishmaniose tem sido escasso. Os fármacos atualmente utilizados estão a tornar-se obsoletos, devido em grande parte à resistência desenvolvida pelo parasita, sendo necessário explorar novos alvos e novas estratégias terapêuticas. O primeiro passo para a descoberta de novos fármacos é descobrir o possível alvo numa via biológica específica, sendo que este alvo deve ser inexistente no hospedeiro ou, caso exista, ser consideravelmente diferente.

É neste contexto que surgem as DNA topoisomerasas, enzimas essenciais para a sobrevivência do parasita. As DNA topoisomerasas de *Leishmania* sp. e as DNA topoisomerasas dos mamíferos têm várias características em comum, mas possuem também diferenças significativas, que fazem delas uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam seguros, eficazes e de fácil administração.

10. Bibliografia

1. Seifert, K. (2011). Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 5, 31–9.
2. Das, B. B., Sen, N., Dasgupta, S. B., Ganguly, A., Das, R., & Majumder, H. K. (2006). Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. *The Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 221–32.
3. Das, B. B., Sengupta, T., Ganguly, A., & Majumder, H. K. (2006). Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? *Molecular Microbiology*, 62(4), 917–27.
4. Fidalgo, L. M., & Gille, L. (2011). Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharmaceutical Research*, 28(11), 2758–2770.
5. Singh, N., Mishra, B. B., Bajpai, S., Singh, R. K., & Tiwari, V. K. (2014). Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(1), 18–45.
6. McGwire, B. S., & Satoskar, a R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 107(1), 7–14.
7. Bayas, J. P., Oswal, R. J., & Anglais, A. E. (2012). Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: A Review, 1(1), 7–22.
8. Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(6), 485–97.
9. Majumder, H. K., de Souza, W., & Chang, K. P. (2011). Target Identification and Intervention Strategies against Kinetoplastid Protozoan Parasites. *Molecular Biology International*, 2011, 185413.
10. Das, P., Alam, M. N., Paik, D., Karmakar, K., De, T., & Chakraborti, T. (2013). Protease inhibitors in potential drug development for Leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 50(5), 363–76.
11. Das, B., Ganguly, A., & Majumder, H. (2008). DNA topoisomerases of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. *Targets in Kinetoplastid Parasites*. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-77570-8_9
12. Tse-Dinh, Y.-C. (2007). Exploring DNA topoisomerases as targets of novel therapeutic agents in the treatment of infectious diseases. *Infectious Disorders Drug Targets*, 7(1), 3–9.
13. Chowdhury, S., Mukherjee, T., Sengupta, S., Chowdhury, S. R., Mukhopadhyay, S., & Majumder, H. K. (2011). Novel Betulin Derivatives as Antileishmanial Agents with Mode of Action Targeting Type IB DNA Topoisomerase, 694–703.
14. Banerjee, B., Sen, N., & Majumder, H. K. (2011). Identification of a Functional Type IA Topoisomerase, LdTopIII β , from Kinetoplastid Parasite *Leishmania donovani*. *Enzyme Research*, 2011, 230542.

15. Chowdhury, S., Mukherjee, T., Mukhopadhyay, R., Mukherjee, B., Sengupta, S., Chattopadhyay, S., Majumder, H. K. (2012). The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. *EMBO Molecular Medicine*, 4(10), 1126–43.