

DANILO CICCONE MIGUEL

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE TAMOXIFENO NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE EXPERIMENTAL E
INVESTIGAÇÃO SOBRE SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração:

Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Reni Bortolin Uliana

São Paulo
2011

RESUMO

Miguel DC. Caracterização da atividade de tamoxifeno no tratamento da leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O tratamento de indivíduos que apresentam leishmaniose, seja ela cutânea ou visceral, é usualmente problemático, uma vez que os medicamentos utilizados na prática clínica são altamente tóxicos, requerem administração parenteral e nem sempre promovem a cura dos pacientes. Torna-se clara, portanto, a necessidade de se pesquisar novos fármacos com potencial leishmanicida. O objetivo da presente Tese de Doutorado foi caracterizar a atividade do tamoxifeno, composto utilizado no tratamento do câncer de mama há décadas, contra diferentes espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*, além de identificar seu possível mecanismo de ação. As concentrações inibitórias de tamoxifeno para 50% de culturas de parasitas tanto de cepas de laboratório como de isolados recentes de pacientes variaram de 5 a 20 μ M. Além disso, nossos resultados mostraram que a aplicação intraperitoneal de 20 mg/kg/dia de citrato de tamoxifeno por duas semanas levou à redução significativa no tamanho das lesões e das úlceras na base da cauda de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, bem como à diminuição da carga parasitária. Diferentes modelos de infecção animal comprovaram ainda a eficácia de tamoxifeno contra *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. Apesar da atividade deste fármaco estar diretamente relacionada à inibição da ligação de estrógeno ao seu receptor, ele exibe efeitos moduladores da atividade de proteínas sinalizadoras em concentrações próximas às efetivas contra *Leishmania*. Primeiramente verificamos que tamoxifeno foi capaz de induzir rapidamente a alcalinização de vacúolos de macrófagos peritoniais contendo amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo este um efeito observado em períodos curtos e longos de incubação com a droga. Esta alcalinização parece não estar diretamente relacionada à morte dos parasitas pela alteração imediata das condições ideais do meio necessário à sobrevivência das formas amastigotas, mas sim ligada ao aumento do efeito leishmanicida de tamoxifeno, uma vez que este composto apresentou-se mais ativo na

faixa de pH neutro a moderadamente alcalino. Outro alvo investigado foi a biossíntese de isoprenóides de promastigotas. Células tratadas com tamoxifeno apresentaram redução global na biossíntese de farnesol, geraniol, dolicol, ergosterol e ubiquinona após marcação metabólica com [¹⁴C]-leucina, indicando que tamoxifeno não interfere especificamente na síntese de cada um destes produtos. Iniciamos também a investigação dos efeitos do tamoxifeno no metabolismo de ceramidas em *Leishmania* adotando a estratégia de marcação metabólica de promastigotas com C₆-NBD-ceramida. Verificamos que promastigotas de *Leishmania* são capazes de incorporar eficientemente ceramida conjugada ao fluoróforo NBD. Em nossos ensaios, a incubação de promastigotas tanto com os inibidores clássicos da via de biossíntese de esfingolipídios como com tamoxifeno resultou na alteração do perfil de incorporação dos precursores utilizados. O tratamento com tamoxifeno aumentou a biossíntese de glucosilceramida acetilada, elevou os níveis de ceramida acilada e diminuiu a biossíntese de fosfoesfingolipídios de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Finalmente, nossos dados mostraram ainda que tamoxifeno permeabiliza a membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e, a partir de estudos por microscopia eletrônica de transmissão, verificamos que este fármaco alterou a estrutura mitocondrial dos parasitas e provocou intensa vacuolização do citoplasma. Os resultados apresentados neste trabalho configuram o primeiro relato da atividade de tamoxifeno contra *Leishmania* e justificam a realização de futuros testes deste fármaco como uma alternativa na quimioterapia da leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*. Leishmaniose. Quimioterapia. Infecção Experimental. Tamoxifeno. Esfingolipídios.

ABSTRACT

Miguel DC. Activity of tamoxifen in the treatment of experimental leishmaniasis and investigation on its mechanisms of action. [Ph.D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis is challenging, since the drugs used are frequently ineffective, very toxic and require parenteral administration. Therefore, the discovery of new drugs with leishmanicidal activity is in pressing need. The objective of this thesis was to characterize the activity of tamoxifen, a drug used in the treatment of breast cancer for decades, against *Leishmania* spp. *in vitro* and *in vivo*, and to identify its possible mechanism of action. The inhibitory concentrations of tamoxifen for 50% of parasite cultures, from reference strains and recent isolates from patients, ranged from 5 to 20 μ M. Moreover, we showed that the intraperitoneal administration of 20 mg/kg/day tamoxifen citrate for two weeks led to significant reductions in the lesion and ulcer sizes and parasite burden in *L. (L.) amazonensis*-infected BALB/c mice. Additionally, the administration of tamoxifen in two other models of animal infection proved its effectiveness against *L. (L.) chagasi* and *L. (V.) braziliensis*. In an attempt to characterize tamoxifen's mechanism of action against *Leishmania*, we found that this drug was able to induce a rapid alkalization of macrophage vacuoles containing *L. (L.) amazonensis* amastigotes. This phenomenon does not appear to be related to the death of the parasites, but rather is linked to an increased antileishmanial effect of tamoxifen. Another target investigated was the interference of tamoxifen in the biosynthesis of isoprenoids. Treated cells showed an overall reduction in the biosynthesis of farnesol, geraniol, dolichol, ergosterol and ubiquinone after metabolic labeling with [14 C]-leucine, indicating that tamoxifen does not interfere specifically in the synthesis of those products. We have also studied the effects of tamoxifen on *Leishmania* ceramide metabolism. The strategy adopted was the metabolic labeling of promastigotes with C₆-NBD-ceramide. Our results showed that *Leishmania* is able to incorporate NBD-ceramide. The incubation of promastigotes with classical inhibitors of sphingolipid biosynthesis as well as with tamoxifen resulted

in striking modifications in the pattern of sphingolipid biosynthesis. *L. (L.) amazonensis* promastigotes treated with tamoxifen showed increased biosynthesis of acetylated glucosylceramide and acyl-ceramide and decreased synthesis of phosphosphingolipids. Finally, our data showed that tamoxifen induced the permeabilization of the promastigote plasma membrane and, based on studies using transmission electron microscopy, we found that this drug altered the mitochondrial structure and caused intense cytoplasmic vacuolization. The results presented here comprise the first report of the activity of tamoxifen against *Leishmania* and offer support for future trials to evaluate tamoxifen as an alternative for leishmaniasis chemotherapy.

Key words: *Leishmania*. Leishmaniasis. Chemotherapy. Experimental Infection. Tamoxifen. Sphingolipids.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As Doenças Negligenciadas

O termo Doenças Negligenciadas (DNs) refere-se a doenças de alto impacto social que acometem regiões pobres e emergentes no mundo e, por isso, despertam interesse restrito da indústria farmacêutica e do meio acadêmico (Lapa e Silva, 2008). A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, WHO) considera atualmente cerca de 20 enfermidades excluindo a malária e a tuberculose como DN de alta importância, incluindo a dengue, esquistossomose, hanseníase, helmintíases adquiridas pelo contato com solo, leishmaniose em suas diversas manifestações clínicas e tripanossomíase africana e americana (WHO, 2010). Estudos apontam que parcelas inferiores a 10% do auxílio financeiro direcionado para pesquisas destinam-se aos programas nos quais se enquadram as DN quando comparados ao investimento na pesquisa em AIDS, malária e tuberculose. Algumas DN como helmintíases intestinais podem acometer grandes contingentes da população, levando a infecções crônicas e baixas taxas de mortalidade, enquanto outras como a tripanossomíase africana e a leishmaniose visceral atingem uma parcela relativamente menor da população, embora sendo muitas vezes rapidamente fatais (All-Party Parliamentary Malaria Group - APPMG, 2008/9). Segundo estimativas da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO), escritório regional da WHO nas Américas, aproximadamente 570 milhões de pessoas residentes em países caribenhos e latino-americanos em 2005 estavam expostas ao risco de infecção por alguma DN. Deste total da população: 17,6% encontravam-se infectados por *Trichuris*, 14,6% por *Ascaris*, 6% por ancilostomídeos e 3,2% por *Trypanosoma cruzi*.

Estimativas apontavam que 1,6% da população brasileira (cerca de 3 milhões de casos) encontrava-se infectada por *Schistosoma mansoni* em 2005 e mais de 3.500 casos de leishmaniose visceral haviam sido reportados em 2004 (PAHO/WHO, 2007). Além disso, o Brasil detem a maioria dos casos de DN da América Latina e Caribe, segundo levantamento realizado por Hotez em editorial publicado no periódico *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Hotez, 2008).

Além de causarem sofrimento massivo, anemia, desnutrição, deformação e deficiência física em estágios crônicos, as DN levam a altos níveis de mortalidade,

ocasionando prejuízos sociais e econômicos para as populações afetadas (Hotez et al., 2009; Feasey et al., 2010). Embora bem sucedidos, recentes investimentos em políticas de saúde pública objetivando o controle das DNs – como os programas de erradicação da dracunculíase, hanseníase e oncocercíase (Feasey et al., 2010) – ainda se mostram incipientes na redução do impacto global das DNs, visto que o número de casos de infecções por diversos protozoários e helmintos vem aumentando nas últimas décadas. Tal realidade representa um enorme desafio para os governos de países pobres e em desenvolvimento, incluindo o Brasil, que urgentemente necessitam estabelecer políticas de rotina de vigilância epidemiológica e coleta de dados para as DNs, bem como ampliar o investimento em pesquisas de novas ferramentas para diagnósticos mais eficazes, desenvolvimento de vacinas e novas alternativas quimioterápicas para o tratamento dos doentes (Morel et al., 2005; Hotez e Ferris, 2006; Hotez et al., 2009).

1.2 Aspectos gerais da leishmaniose e seu agente etiológico

Conforme citado anteriormente, a leishmaniose é uma das mais impactantes DNs por ocupar a quinta posição em prevalência no mundo, com casos registrados em 88 países distribuídos em 4 continentes (**Figura 1**). Anteriormente considerada uma doença rural, a leishmaniose vem se expandido para áreas mais urbanizadas com estimativa de 1,6 milhão de pessoas infectadas por ano, sendo 500 mil casos da forma visceral (basicamente concentrados em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão) e mais de um milhão de casos da forma cutânea - incluindo suas subdivisões clínicas - ocorrendo em sua maioria no Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Bolívia, Brasil, Irã, Peru, Síria e Sudão (WHO, 2010). A expansão do número de doentes tornou-se evidente a partir da década de 1990 e se estende até os dias atuais. No Brasil, por exemplo, foi verificado o aumento no número de casos de leishmaniose visceral principalmente na região Nordeste, além da detecção de casos da forma cutânea para todos os estados da Federação. Isso pode ser explicado principalmente pela mudança no padrão de distribuição geográfica da doença que se propagou para áreas periféricas

de grandes centros urbanos associada à invasão e ocupação indevida de áreas de mata. Todavia, também deve ser considerado o processo de organização da rede de assistência relacionada ao diagnóstico e tratamento levando à detecção mais efetiva do número de casos (PAHO/WHO, 2007). Países como o Afeganistão, em 2002, e a Etiópia, em 2005, experimentaram grandes epidemias de leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente (WHO, 2010).

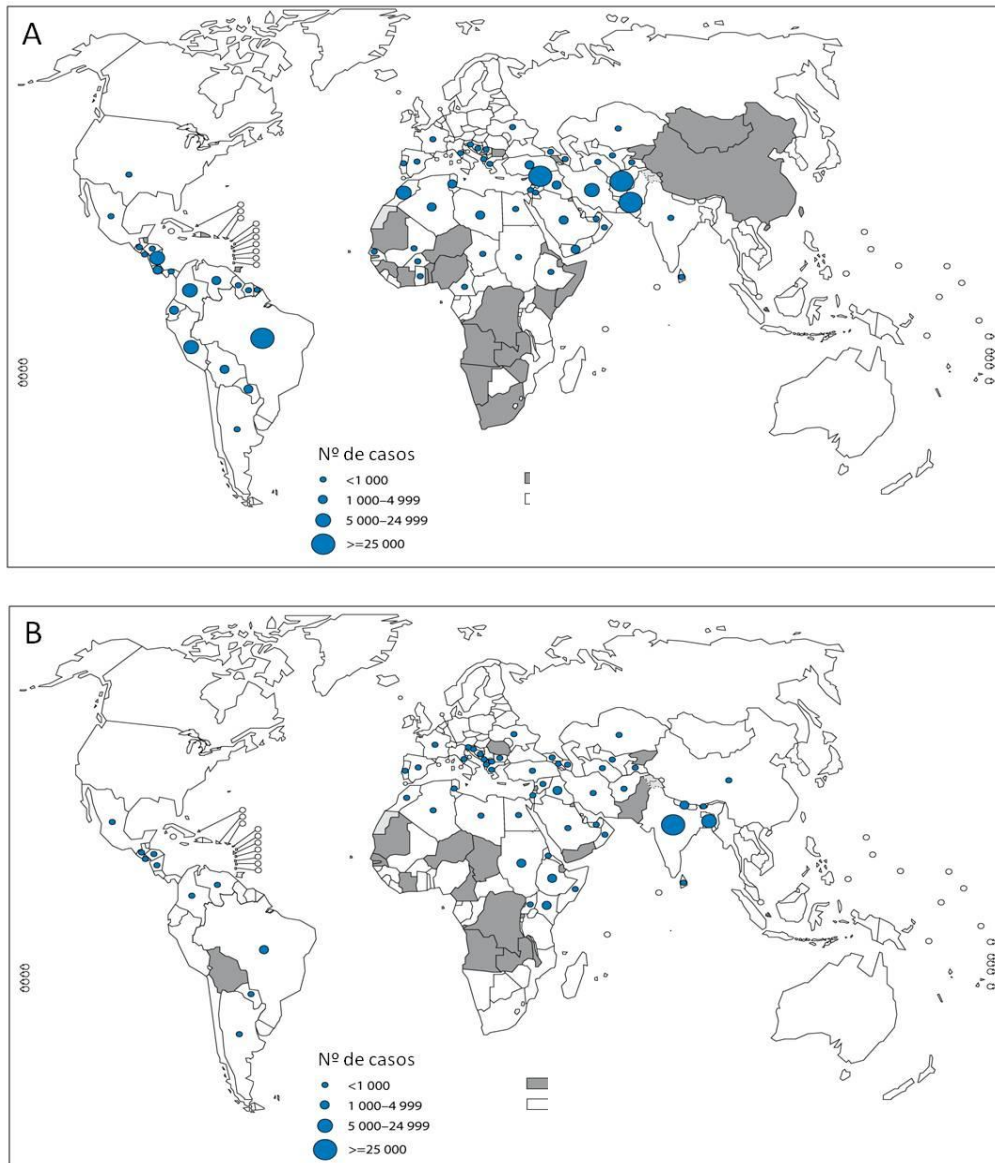


Figura 1. Distribuição global da leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) segundo levantamento de número de casos realizado pela Organização Mundial da Saúde entre 2005 e 2009. Os países em cinza destacam-se pela endemia, porém, sem registros oficiais do número de casos.
Fonte: Adaptado de WHO, 2010 – *First WHO Report on Neglected Tropical Diseases*, 2010.

Os agentes causadores da leishmaniose são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. São parasitas heteroxenos, sendo assim, alternam o ciclo biológico entre hospedeiros distintos: um invertebrado (limitando-se à infecção de fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) e um vertebrado (abrangendo diversas classes de mamíferos e alguns répteis) (Lainson e Shaw, 1987). Ao longo do ciclo, os parasitas sofrem importantes alterações morfológicas e bioquímicas, mas ainda assim conservam uma típica estrutura flagelar proeminente ou reduzida e o cinetoplasto. Este último, ao qual o nome dado à ordem faz referência, consiste em um aglomerado de moléculas de DNA circulares dotado de um complexo mecanismo de replicação que está encerrado na mitocôndria única do parasita (revisado por Liu et al., 2005).

Durante seu ciclo de vida, o parasita é tomado pelo inseto hematófago flebotomíneo durante a ingestão de sangue de um animal infectado. Neste caso, o estágio parasitário é denominado amastigota, consistindo em uma forma arredondada obrigatoriamente intracelular e de flagelo reduzido. Ao atingirem o tubo digestivo do inseto vetor há a transformação das formas amastigotas para promastigotas (forma flagelada, fusiforme e extracelular), que permanecem aderidos às microvilosidades do intestino médio. Após 4 a 7 dias, período que varia de acordo com a espécie de *Leishmania*, diversas modificações na morfologia e na superfície celular do parasita ocorrem, permitindo em última instância a liberação dos promastigotas dos microvilos que se acumulam no esôfago do inseto. O processo de diferenciação que ocorre no intestino do vetor é denominado metaciclogênese e é caracterizado pela transformação das formas que se dividem (promastigotas procíclicos), em formas menores altamente móveis incapazes de se dividir, denominadas promastigotas metacíclicos. Quando o inseto realizar um novo repasto sanguíneo, os promastigotas metacíclicos serão inoculados no hospedeiro mamífero, onde terão de subverter os mecanismos de defesa inatos e infectar principalmente macrófagos permanecendo no interior de fagolisossomos. Sinais como o aumento da temperatura e a diminuição do pH são cruciais para a diferenciação da forma promastigota para amastigota que se dividirá até a ruptura da célula hospedeira. Os amastigotas liberados são então fagocitados por outras células da linhagem macrofágica tanto localmente quanto em

tecidos distantes após a disseminação (Lainson e Shaw, 1987; Sacks e Kamhawi, 2001; Rey, 2008). Após períodos de semanas a meses, a leishmaniose pode se manifestar em diferentes formas clínicas. Hospedeiros humanos são geralmente acidentais. Classicamente apresentam a forma cutânea, que pode atingir a pele, linfonodos e mucosas, ou a forma visceral da doença com comprometimento do baço, medula óssea e fígado. Essa última é capaz de provocar a morte do indivíduo não tratado (Ashford, 2000; Murray et al., 2005).

Cerca de 20 espécies transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos levam ao amplo espectro clínico da leishmaniose, que também será influenciado pela resposta imune do hospedeiro além de variações regionais (Herwaldt, 1999; Handman, 2001; Murray et al. 2005).

1.3 Leishmaniose cutânea

Na leishmaniose cutânea o período de incubação varia de duas semanas a dois meses após a picada do inseto (Grimaldi, 1982). A doença se inicia com pequenas pápulas eritematosas, que aumentam vagarosamente de tamanho, transformando-se em nódulos e posteriormente em lesões ulceradas (Rey, 2008). A ocorrência da leishmaniose cutânea no Novo Mundo está principalmente associada às seguintes espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. No Velho Mundo essa forma da doença ocorre principalmente na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e sul da Ásia e as espécies envolvidas são *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. No Brasil as espécies responsáveis pelas maiores taxas de infecção são *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Grimaldi, 1982; Rey, 2008).

A forma cutânea localizada pode evoluir para cura e cicatrização espontânea, apesar de requerer meses ou anos, a despeito da espécie causadora (Bern et al., 2008). Cerca de 1 a 10% dos casos de leishmaniose cutânea pode evoluir para uma manifestação clínica mais complexa denominada leishmaniose mucocutânea ou mucosa que no Brasil é causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (Amato et

al., 2007; Guerra et al., 2011). Trata-se de uma forma grave que pode levar à destruição do septo nasal, palato e outras estruturas da mucosa, geralmente com resposta insatisfatória a drogas específicas. Em situações mais severas pode levar a mutilações faciais e em alguns casos mais raros levar a infecções bacterianas secundárias, com evolução para septicemia e óbito (Marsden, 1990; Oliveira et al., 2005; Velozo et al., 2006).

Outras manifestações raras da leishmaniose cutânea incluem as formas difusa, disseminada e recidivante, para as quais a resposta à terapêutica é pobre. A primeira, normalmente causada por *L. (L.) amazonensis*, evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas repletas de parasitas, recobrando extensas áreas da pele. A forma disseminada pode ser causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e leva a um quadro de múltiplas lesões papulares não nodulares que acometem vários segmentos corporais, frequentemente a cabeça e o tronco. Por último, a forma recidivante apresenta-se como uma doença crônica que desencadeia a formação de lesão facial solitária com baixa carga parasitária. É causada por espécies do Velho Mundo, sendo mais comum em países do Oriente Médio (Franke et al., 1990; Convit et al., 1993; Herwaldt, 1999; Brasil - SVS-Fiocruz/Ministério da Saúde, 2011).

A distribuição de casos de leishmaniose cutânea no território brasileiro é ampla, atingindo todas as regiões, sendo a Norte a detentora do maior número de casos para o período de 2002 a 2009. De acordo com levantamento da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, foram notificados 21.824 casos da doença no Brasil em 2009 (Brasil - SINAN/SVS/Ministério da Saúde, 2010).

1.4 Leishmaniose visceral ou calazar

Trata-se de uma doença crônica e sistêmica de período médio de incubação entre 2 a 4 meses. Os sinais e sintomas consistem em febre de longa duração, emagrecimento, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, caquexia, micropoliadenopatia, hemorragias e leucopenia. Se não tratada, a doença evolui para o óbito em 1 a 2 anos após o aparecimento dos sintomas (Roberts e Janovy, 2000). As

espécies causadoras são *L. (L.) donovani* na África Oriental, Índia e China, *L. (L.) infantum* no Mediterrâneo, outras regiões da África, Oriente Médio e China e, no continente americano, é atribuída à *L. (L.) chagasi* (sinonímia de *L. (L.) infantum*) (revisado em Mauricio et al., 2000; Rey, 2008).

Existem algumas variações da leishmaniose visceral clássica como a leishmaniose dérmica pós-calazar mais comumente decorrente de infecção por *L. (L.) donovani*, na qual há o aparecimento de lesões cutâneas secundárias meses ou anos após a resolução do calazar. Mais raramente, a leishmaniose viscerotrópica caracteriza-se por uma síndrome com baixas cargas parasitárias de manifestações não-específicas e causadas por *L. (L.) amazonensis* no Novo Mundo e *L. (L.) tropica* no Velho Mundo (Barral et al., 1991; Herwaldt, 1999).

Embora tenha caráter reconhecidamente zoonótico, a leishmaniose visceral na Índia, Paquistão e Bangladesh é uma antroponose, ou seja, o homem é um hospedeiro que participa do ciclo também como reservatório. Tal fato leva a implicações importantes como o aumento no número de pacientes refratários ao tratamento clássico devido à resistência dos parasitas às drogas e o favorecimento da expansão da doença em países populosos como recentemente descrito para uma região não-endêmica do Nepal (Pandey et al., 2011). No caso do Brasil a transmissão envolve canídeos selvagens e cães domésticos. Os cães, apresentando ou não sintomas, podem ser fontes de transmissão atuando como reservatório, o que torna o controle da população dos animais infectados altamente complexo (Lainson e Rangel, 2001). Frequentemente surtos de leishmaniose visceral são temporal e espacialmente precedidos por epidemias caninas, como ocorrido no município de Belo Horizonte entre 1993 e 1996 (Bevilacqua et al., 2001).

O aumento do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil ganhou força a partir dos anos 1990, com destaque para os estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (Centro-Oeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste). No período de 2004 a 2009, os casos brasileiros confirmados para a doença foram superiores a 3500/ano. No ano de 2009, só a região Nordeste contabilizou 47% dos casos brasileiros, com destaque para o estado do Ceará apresentando 629 casos (Brasil - SINAN/SVS/Ministério da Saúde, 2010).

Um fator crucial que deve ser levado em consideração no que diz respeito à incidência da leishmaniose é a sua associação com quadros de imunossupressão, como em pacientes transplantados (Machado et al., 2009) e principalmente em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. Na Etiópia, por exemplo, as taxas de co-infecção HIV/*Leishmania* estão entre 15 a 30% (WHO, 2011). Na década de 1990, países europeus como Espanha, Portugal, França e Itália apresentavam alta prevalência desta co-infecção, porém, mais recentemente, o uso disseminado da terapia antirretroviral tem sido acompanhado de declínio no número de casos. Situação inversa é observada quando se trata da prevalência da co-infecção HIV/*Leishmania* em países da África Subsaariana e do sul da Ásia, que vem aumentando significativamente nos últimos anos (Alvar et al., 2008; Lloyd-Smith et al., 2008). No caso do Brasil, recentes trabalhos reportaram o aumento na incidência desta co-infecção no Nordeste e Centro-Oeste. No estado do Mato Grosso do Sul foi verificado que a leishmaniose visceral é a primeira infecção oportunista para 60% dos casos de pacientes HIV-positivos (Botelho e Natal, 2009; Alexandrino-de-Oliveira et al., 2010; Nascimento et al., 2011). Em indivíduos portadores do vírus HIV com severa imunossupressão, o quadro de leishmaniose visceral costuma ser bastante grave com comprometimento de áreas não-usuais como o trato gastrointestinal. Na ausência de terapia antirretroviral eficaz as taxas de recaída após tratamento podem chegar a 100% (revisado em Bern et al., 2008). Herwaldt assinala que as tendências de invasão urbana da leishmaniose e da expansão da infecção pelo HIV para áreas rurais são fatores capazes de promover o aumento no número de pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania* no mundo (Herwaldt, 1999).

1.5 Controle da leishmaniose

O controle da leishmaniose deve ser estabelecido de acordo com os aspectos eco-epidemiológicos das diferentes formas da doença (revisado em Vioukov, 1987). A forma zoonótica requer uma série de medidas que envolvem:

- a. Controle direto do vetor (controle químico, ecológico, biológico ou genético);
- b. Controle do agente etiológico baseado no tratamento de doentes a exemplo do ocorrido na China, onde significativa redução no número de casos de leishmaniose visceral foi verificada após intenso trabalho de tratamento e cuidado à população doente;
- c. Controle da fonte de infecção (eliminação ou contenção de animais que sirvam como reservatórios para o parasita);
- d. Proteção do indivíduo contra a infecção através do uso de repelentes contra flebotomíneos e eventualmente pela utilização de uma vacina.

Ainda nos dias de hoje não existe nenhuma vacina disponível contra a leishmaniose. É consenso que uma vacina capaz de imunizar o homem ou mesmo uma vacina eficaz para cães tornar-se-ia a medida profilática ideal no controle da leishmaniose. Contudo, diversos obstáculos ainda precisam ser ultrapassados para que se estabeleça uma vacina ativa e segura. Dentre as maiores dificuldades estão: a falta de conhecimento acerca da complexidade dos mecanismos imunológicos decorrentes da infecção por *Leishmania*; a transposição de testes em modelos de infecção animal para testes pré-clínicos e clínicos; a busca por antígenos ideais que se mostrem capazes de ativar uma resposta protetora persistente contra a infecção, entre outros (Vioukov, 1987; Kedzierski et al., 2006). Em relação ao uso de repelentes, existem controvérsias em alguns estudos disponíveis na literatura, uma vez que a ação repelente de inseticidas aplicados diretamente na pele pode ter ação variável e, muitas vezes, as pessoas subestimam a importância dos flebotomíneos em relação à picada de outros insetos. Quanto à impregnação de inseticidas em telas de proteção, um ensaio clínico randomizado e pareado realizado recentemente mostrou que o uso de redes contendo repelentes não preveniu infecções por *L. (L.) donovani* na Índia e Nepal quando comparado ao uso de *sprays* residuais ou mesmo redes de proteção não impregnadas com repelentes (Vioukov, 1987; Moosa-Kazemi et al., 2007; Picado et al., 2010). Contudo, como sinaliza Desjeux (2010), estudos como o de Picado e colaboradores devem ser realizados com o intuito de se aperfeiçoar um método repelente eficaz contra a picada destes insetos, a exemplo do sucesso com o uso de telas de proteção em áreas devastadas pela malária (Desjeux, 2010).

Já a forma antroponótica da doença deve ser controlada a partir da erradicação da população de flebotomíneos em áreas endêmicas, que pode ser alcançada por medidas como aquelas citadas anteriormente, além da melhoria de condições sanitárias e de limpeza que auxiliem na eliminação de focos de reprodução do inseto vetor. A partir da redução nas taxas de infecção, torna-se mais bem sucedida a detecção de casos e, finalmente, o tratamento dos doentes passa a se configurar como a principal forma de controle da leishmaniose (Vioukov, 1987; Bern e Chowdhury, 2006).

1.6 Terapêutica da leishmaniose

Além do tratamento da leishmaniose ser de importância inegável para a melhora do paciente, é possível notar a partir das informações acima que este se configura como uma importante estratégia de controle da doença. Infelizmente, porém, os medicamentos em uso na clínica estão sobremaneira distantes de serem ideais (revisado em Dujardin et al., 2010).

A terapêutica das leishmanioses é baseada principalmente no uso de antimoniais, cuja aplicação foi introduzida pelo brasileiro Gaspar Vianna em 1912 a partir do tártaro emético para tratamento da leishmaniose mucocutânea (Rey, 2008). Atualmente utilizam-se os antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio ou antimoniato de meglumine (Glucantime®, Sanofi-Aventis, Suzano, São Paulo, Brasil) como drogas de primeira escolha tanto para leishmaniose visceral quanto para a cutânea. Esses medicamentos são de administração parenteral obrigatória por pelo menos 20 dias, apresentam eficácia variável e podem provocar efeitos adversos, alguns dos quais bastante graves como arritmias cardíacas, pancreatite e nefro e hepatotoxicidade (revisado em Singh e Sivakumar, 2004). Apesar do uso difundido do estibogluconato de sódio, sua estrutura química ainda não foi totalmente elucidada. Contudo, acredita-se que sua eficácia contra as formas amastigotas possa estar relacionada à sua conversão em uma estrutura trivalente letal para esse estágio do parasita (revisado em Croft e Coombs, 2003). Uma série de estudos demonstrou

possíveis mecanismos de ação do estibogluconato de sódio que incluem a inibição na produção de ATP por interferência na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (Berman et al., 1987), indução de morte celular do tipo apoptose (Sereno et al., 2001) e inibição de enzimas do parasita como a glutathione redutase e a tripanotona redutase (Cunningham e Fairlamb, 1995).

Desde a década de 1980, relatos clínicos demonstraram que a administração de antimoniais já não se fazia mais tão eficaz na cura da leishmaniose visceral como na década anterior. Desde então foi preconizado o tratamento com doses superiores de antimoniais por períodos mais prolongados, mas que não surtiu o efeito esperado em regiões ao Norte da Índia, principalmente no estado de Bihar (Sundar et al., 2001). Entre 50 a 65% dos pacientes desta região mostraram-se refratários ao tratamento, fato posteriormente explicado a partir da detecção de isolados de *L. (L.) donovani* altamente resistentes ao antimônio (Lira et al., 1999). Isolados obtidos de pacientes sudaneses também foram resistentes aos antimoniais em ensaios *in vitro*, resultado que concorda com os achados de Yardley e colaboradores para isolados do Peru em 2006 (Sharief et al., 2006, Yardley et al., 2006). No caso do Brasil o índice de sucesso terapêutico com Glucantime[®] era considerado alto, com aproximadamente 95% de cura. Em Teresina, Piauí, foi verificado que cerca de 5% dos pacientes não responderam ao tratamento com a droga de primeira escolha, requerendo tratamentos a partir de outros grupos de medicamentos (Santos et al., 2002; Werneck et al., 2003). Relatos mais recentes indicam, entretanto, que a eficácia do tratamento com antimoniais seja mais baixa (Tuon et al. 2008). Outro estudo realizado na região Amazônica mostrou que o tratamento com Glucantime[®] em pacientes com leishmaniose cutânea levou a índices de cura inferiores a 55% (Chrusciak-Talhari et al., 2011).

As drogas de segunda escolha no tratamento de leishmaniose incluem a anfotericina B e a pentamidina. O desoxicolato de anfotericina também é de administração parenteral e os efeitos tóxicos cumulativos são intensos. A utilização de anfotericina encapsulada em lipossomos ou associada a lipídios reduz a dose necessária para o tratamento da leishmaniose visceral, mas com custos normalmente restritivos para o tratamento em larga escala em zonas endêmicas (revisado em Murray, 2001). Entretanto, Sundar e colaboradores evidenciaram recentemente que o

uso de uma única dose infundida de anfotericina B lipossomal (10 mg/kg) foi equivalente à administração de 15 doses (1 dose = 1 mg/kg) de desoxicolato de anfotericina em dias alternados durante 29 dias de hospitalização, inclusive com redução dos custos (Sundar et al., 2010). Existe um número limitado de estudos que sugerem a eficácia da formulação lipossomal para casos de leishmaniose tegumentar. Geralmente os relatos incluem pequenos grupos de pacientes ou indivíduos imunossuprimidos infectados que são tratados com a formulação após falha com antimoniais e, além disso, o tratamento mostra-se muitas vezes eficaz para infecções por determinadas espécies de *Leishmania* ou para uma dada região geográfica (Brown et al., 2005; revisado em Wortmann et al., 2010; Motta e Sampaio, 2011). Quanto ao mecanismo de ação da anfotericina, sabe-se que está principalmente relacionado à formação de poros na membrana do parasita, uma vez que atua substituindo esteróides, como o ergosterol, na bicamada lipídica. Essa interferência é capaz de alterar o balanço iônico da célula levando à sua destruição (Croft e Coombs, 2003; Neumann et al., 2010).

O uso da pentamidina, por sua vez, leva a quadros de elevada toxicidade com efeitos que incluem mialgia, náusea e hipotensão (Singh e Sivakumar, 2004). O uso da pentamidina é reservado apenas aos casos de falha terapêutica com antimoniais e anfotericina B. Contudo, sua eficácia na leishmaniose cutânea é questionável uma vez que seu índice de sucesso em estudos na América Latina parece variar de acordo com a região geográfica e a espécie do parasita (Soto-Mancipe et al., 1993; Lightburn et al., 2003; Andersen et al., 2005). A aplicação da pentamidina para leishmaniose visceral antroponótica na Índia já não é mais recomendada porque desencadeia efeitos colaterais bastante intensos já que as doses empregadas são mais altas e também devido à circulação de cepas de parasitas resistentes à droga (Thakur et al., 1991; Singh e Sivakumar, 2004). Trabalhos mostraram que o mecanismo de ação leishmanicida da pentamidina parece estar baseado no acúmulo da droga no parasita, o que levaria à sua associação ao DNA do cinetoplasto. Somado a isso, esta molécula parece desencadear o colapso do potencial de membrana mitocondrial (revisado em Bray et al., 2003).

Diversos estudos focaram seus objetivos na tentativa de encontrar terapias alternativas para o tratamento da leishmaniose. Dentre estas talvez a mais promissora

refira-se à utilização de derivados de lisofosfatidilcolina como a hexadecilfosfocolina (miltefosine), eficaz contra *L. (L.) donovani* (Achterberg e Gercken, 1987). Um primeiro ensaio clínico de fase II realizado em 1997 mostrou que a administração oral de miltefosine foi eficaz no tratamento de pacientes indianos com leishmaniose visceral (Sundar et al., 1998). Após uma série de resultados promissores em novos ensaios clínicos mostrando que miltefosine levou a taxas de cura entre 94 e 97%, sua utilização foi aprovada para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia e para outras manifestações da doença. Os principais efeitos colaterais associados são distúrbios gastrintestinais, mas a maior limitação do miltefosine é seu potencial teratogênico, particularidade que impede o uso em mulheres grávidas (Croft e Coombs, 2003; Singh e Sivakumar, 2004). Vale ressaltar que Pérez-Victoria e colaboradores demonstraram em 2003 a existência de linhagens de *L. (L.) donovani* resistentes ao miltefosine (Pérez-Victoria et al., 2003). Além disso, Soto et al. (2004) demonstraram que, apesar de bem tolerada, a aplicação de miltefosine em pacientes com leishmaniose cutânea não foi tão eficaz no tratamento tanto de infecções por *L. (V.) braziliensis* na Colômbia quanto por *L. (V.) panamensis* na Guatemala (Soto et al., 2004). Por outro lado, os resultados de um ensaio clínico recentemente publicado mostram que a utilização de miltefosine em pacientes do estado da Bahia infectados com *L. (V.) braziliensis* levou a taxas de cura superiores às obtidas pela administração de antimonial pentavalente (Machado et al., 2010).

Estudos apontam que o mecanismo de ação do miltefosine parece estar primeiramente relacionado à ação na membrana plasmática parasitária e posterior interferência na transdução de sinal, homeostase de cálcio e inibição da síntese de fosfatidilcolina e RNA (Croft e Coombs, 2003; Azzouz et al., 2005).

Uma segunda droga em fase de testes clínicos é a paromomicina (Croft et al., 2006), um antibiótico aminoglicosídico cuja atividade leishmanicida foi verificada inicialmente na década de 1960. Apesar da baixa biodisponibilidade oral da paromomicina, ensaios em Bihar, na Índia, demonstraram atividade promissora da droga em pacientes refratários aos antimoniais (Thakur et al., 2000). O uso injetável da droga levou a taxas de cura em torno de 80% para pacientes com leishmaniose visceral no Quênia (Chunge et al., 1990). Entretanto, tais resultados parecem contraditórios quando comparados a resultados mais recentes que relataram eficácia parcial da

paromomicina em formulações tópicas específicas ou associadas a antimoniais (Asilian et al., 2003; Armijos et al., 2004; Gonçalves et al., 2005; Irají et al., 2005). São descritos como os principais efeitos colaterais da paromomicina a toxicidade para os rins e para o nervo auditivo (Singh e Sivakumar, 2004). A ação leishmanicida deste aminoglicosídeo parece estar relacionada à interferência na atividade mitocondrial do parasita, a partir da inibição da respiração celular e despolarização da membrana (Croft e Coombs, 2003; Croft et al., 2006).

Outras drogas tem sido utilizadas como alternativas para o tratamento da leishmaniose, incluindo os azóis, moléculas capazes de interferir na biossíntese de ergosterol do parasita; o alopurinol, um análogo de purinas; o imiquimod, um agente imunomodulador capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados pelo parasita; o sitamaquine, um análogo da primaquina com atividade leishmanicida, capaz de se acumular no parasita e interagir transitoriamente com sua membrana plasmática; além de técnicas baseadas em crioterapia e termoterapia diretamente aplicadas a lesões cutâneas (Croft et al., 2006; Singh e Sivakumar, 2004; Ameen, 2010; Coimbra et al., 2010). Existem alguns ensaios clínicos que avaliaram os índices de sucesso terapêutico destas drogas bem como de terapias alternativas, contudo, mostram-se muitas vezes controversos. Nota-se que para determinadas regiões e espécies de *Leishmania* existe algum progresso com o uso de novas formulações, ao passo que para outras áreas pode-se notar a ausência de respostas terapêuticas satisfatórias, representando assim um desafio para a incorporação de novos esquemas terapêuticos (Soto-Mancipe et al., 1993; Blum et al., 2004; Singh e Sivakumar, 2004; Wasunna et al., 2005; Ameen et al., 2010).

Dada a dificuldade de se obter resposta satisfatória a partir de monoterapias, emerge atualmente uma tendência mundial focada nos tratamentos combinados como alternativa para o tratamento tanto da leishmaniose cutânea como da visceral. Muitas são as suas vantagens, como o aumento na eficácia e tolerância com redução do período de tratamento e, portanto, maior adesão ao tratamento e redução nos custos; a possibilidade de drogas com estruturas químicas diferentes atuarem em alvos distintos do parasita, reduzindo a probabilidade de indução de resistência; além de maiores chances de sucesso na terapia de pacientes co-infectados por HIV/*Leishmania* (Modabber et al., 2007; van Griensven et al., 2010). Tal iniciativa tem levado ao

planejamento e execução de diversos estudos clínicos em áreas endêmicas tanto para a forma visceral (revisado em van Griensven et al., 2010) como para a forma cutânea da leishmaniose (Miranda-Verástegui et al., 2005; Al-Mutairi et al., 2009; El-Sayed e Anwar, 2010).

1.7 Alternativas para o tratamento da leishmaniose – o caso do tamoxifeno

Ao analisarmos o atual cenário da terapêutica da leishmaniose, é possível identificar a necessidade mandatória de pesquisa de novas drogas, com estrutura e mecanismos de ação distintos das utilizadas até o presente momento (Kayser et al., 2001). Inúmeros relatos na literatura demonstram o potencial leishmanicida de diversos compostos das mais diferentes classes químicas, provenientes de fontes como: a) estruturas vegetais; b) micro-organismos; c) organismos invertebrados; d) derivados de outras moléculas cuja atividade já foi estabelecida; e) medicamentos já disponíveis para diferentes doenças, entre outros (Handman et al., 2008; Kedzierski et al., 2009; Tempone et al., 2011). A maioria dos trabalhos relata a ação destas moléculas em culturas de parasitas, mostrando eficácia contra formas promastigotas e amastigotas, mas nem sempre demonstrando a atividade para modelos *in vivo* de infecção por *Leishmania*. Ainda assim, é inegável a importância deste tipo de estudo visando à varredura e identificação de compostos alternativos que sirvam futuramente como fármacos anti-*Leishmania* ou mesmo como protótipos para a síntese de moléculas mais ativas.

Dentre um amplo espectro de fármacos que tem sido utilizados no tratamento de neoplasias humanas, destaca-se o tamoxifeno ([Z]-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)-fenóxi]-N,N-dimetiletanamina; **Figura 2**). Esse fármaco foi originalmente desenvolvido como um contraceptivo de uso oral cujo potencial antiestrogênico foi logo reconhecido, tornando seu uso clínico contra o câncer de mama metastático muito bem estabelecido desde a década de 1970 (Harper e Walpole, 1966; Goldstein, 1999). Nos últimos 25 anos, tamoxifeno tem sido utilizado em todos os estágios do câncer de mama, embora sua eficácia seja mais significativa para inibição de tumores estrógeno-dependentes (revisado em Morello et al., 2002).

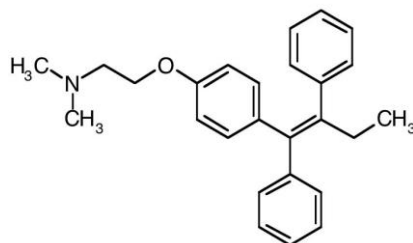


Figura 2. Estrutura química da molécula de tamoxifeno.

O mecanismo de ação desse fármaco está relacionado à sua capacidade de se ligar (em concentrações nanomolares) competitivamente ao receptor de estrógeno no tecido mamário tumoral. A partir daí, forma um complexo capaz de inibir o domínio de ativação AF2 do receptor, o que em última instância leva à inibição de transcrição a partir de promotores responsivos a estrógeno, acarretando a parada do crescimento celular. Logo, o tamoxifeno é um forte antagonista do estrógeno na mama. Entretanto, pode atuar como agonista fraco em diferentes tecidos como o endometrial e ósseo, que apresentam majoritariamente ativação via AF1 em relação ao domínio AF2 (Harvey et al., 1999; revisado em Ali e Coombes, 2002). Tal efeito é de extrema relevância para se estabelecer o período ideal de tratamento com tamoxifeno, uma vez que intervalos prolongados de uso do fármaco parecem estar relacionados à indução de eventos tromboembólicos e aumento do risco de desenvolvimento de câncer endometrial (Bernstein, 1999; Jordan, 2008).

Graças a essa plasticidade, o tamoxifeno é classicamente descrito como um modulador seletivo de receptor de estrógeno (SERM) (Muchmore, 2000; Taras et al., 2001). Todavia, seu mecanismo de ação na terapia e prevenção do câncer de mama ainda não está completamente elucidado.

Diversos estudos apresentados nas últimas décadas demonstraram que o tamoxifeno exibe uma série de efeitos tanto *in vitro* como *in vivo* que não podem ser explicados por meio de sua interação com o receptor estrogênico. Normalmente estes efeitos são verificados a partir de concentrações na faixa de micromolar e parecem estar relacionados à atividade de tamoxifeno para outros tipos de câncer e casos de tumores de mama não-responsivos ao estrógeno (revisado em Gelmann, 1997). Estes efeitos incluem a:

- inibição na síntese de isoprenoides como o dolicol (Santa Cruz et al., 1985),
- interação com membranas celulares (Wiseman et al., 1990; Custódio et al., 1994),
- interferência no metabolismo de esfingolipídios (Cabot et al., 1996; Lavie et al., 1997),
- inibição da acidificação de organelas intracelulares (Altan et al., 1998, 1999; Chen et al., 1999),
- inibição de canais de cloro e cálcio e o aumento da suscetibilidade a drogas em linhagens tumorais multi-resistentes (Lavie et al., 1997; Altan et al., 1999) e
- modulação de diversas proteínas sinalizadoras, ligação a calmodulinas, caspases e proteínas quinases (Mandlekar e Kong, 2001).

A ativação ou inibição de uma ou mais dessas vias de sinalização leva ao desencadeamento de apoptose, podendo esta ser mediada por estresse oxidativo, transição de permeabilidade mitocondrial, acúmulo de ceramidas ou mudanças na fluidez da membrana celular (revisado em Mandlekar e Kong, 2001).

É sabido que a forma amastigota de *Leishmania* localiza-se obrigatoriamente no vacúolo fagolisossômico de macrófagos do hospedeiro vertebrado, sendo este um ambiente tipicamente ácido. Mukkada e colaboradores (1985) verificaram que a atividade metabólica dos amastigotas é ótima para valores de pH próximos a 5,0 (Mukkada et al., 1985). Dessa forma, foi razoável supor que tamoxifeno seria capaz de alterar a acidez de vacúolos macrofágicos contendo amastigotas e que, portanto, poderia ser testado como uma agente anti-*Leishmania*. A interferência nos mecanismos intrínsecos de manutenção do pH poderia promover distúrbios na multiplicação do parasita no interior desses vacúolos. Além disso, o fato deste fármaco já possuir segurança clínica muito bem estabelecida fortaleceu nosso interesse em determinar seu potencial leishmanicida.

A partir destes fundamentos foi avaliada preliminarmente a atividade do tamoxifeno contra culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e, com base em resultados promissores, foi proposto como principal objetivo desta Tese a caracterização aprofundada da atividade deste fármaco contra *Leishmania*, conforme detalhado no item a seguir.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados na presente tese concluímos que tamoxifeno apresenta atividade leishmanicida *in vitro* na faixa de concentração de micromolar para diferentes espécies do parasita. Sua eficácia foi comprovada contra formas axênicas e intracelulares tanto para cepas de laboratório como para isolados recentes de pacientes. Este fármaco também se mostrou eficaz no controle de infecções experimentais para as formas cutânea e visceral da doença, preferencialmente por administração via intraperitoneal. Além disso, tamoxifeno foi ativo contra formas de cultura de *Trypanosoma cruzi*. Um dos metabólitos do tamoxifeno (4-hidróxi-tamoxifeno) e outros membros da família dos SERMs (raloxifeno e toremifeno) também apresentaram efeito leishmanicida.

Apesar da atividade de tamoxifeno contra formas amastigotas não ter sido atribuída à modulação do pH de vacúolos fagolisossômicos, seu efeito foi potencializado após a alcalinização dessas organelas. Tamoxifeno não elevou os níveis de nitrito em sobrenadantes de infecções por *Leishmania* e nem a expressão de iNOS de macrófagos infectados, portanto, seu efeito também não está relacionado à indução da atividade microbicida de NO.

Estudos bioquímicos apontaram que tamoxifeno não altera de forma específica a biossíntese de isoprenoides de *Leishmania*, mas mostraram que este é capaz de permeabilizar a membrana plasmática de promastigotas. Essa permeabilização pode ser devida à partição de tamoxifeno na membrana plasmática, sugerida por ensaios de fracionamento que indicam que parte da droga fica retida nesta estrutura. Alterações mitocondriais e extensa vacuolização citoplasmática também foram verificadas em parasitas tratados com o fármaco.

A investigação da interferência de tamoxifeno no metabolismo de esfingolipídios de *Leishmania* proporcionou, primeiramente, a caracterização da atividade leishmanicida de inibidores de ceramidase e GC sintase de mamíferos. Demonstramos que tamoxifeno alterou o perfil de incorporação de ceramida em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de forma a desencadear o acúmulo de espécies aberrantes de ceramidas aciladas, o aumento no nível de GC acetilada e a redução na formação de fosfoesfingolipídios. Apesar do mecanismo de ação do tamoxifeno não ter sido completamente elucidado, os resultados apresentados aqui evidenciam que

tamoxifeno é capaz de interferir drasticamente na via de biossíntese de esfingolipídios de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Abe A, Wu D, Shayman JA, Radin NS. Metabolic effects of short-chain ceramide and glucosylceramide on sphingolipids and protein kinase C. *Eur J Biochem.* 1992;210(3):765-73.

Achterberg V, Gercken G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;23(2):117-22.

Adam HK, Douglas EJ, Kemp JV. The metabolism of tamoxifen in human. *Biochem Pharmacol.* 1979;28(1):145-7.

Afonso IC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of c57bl/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect immun.* 1993;61(7):2952-9.

Al-Mutairi N, Alshiltawy M, El Khalawany M, Joshi A, Eassa BI, Manchanda Y, Gomaa S, Darwish I, Rijhwani M. Tropical medicine rounds: Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *Int J Dermatol.* 2009;48(8):862-9.

Alexandrino-de-Oliveira P, Santos-Oliveira JR, Dorval ME, Da-Costa FC, Pereira GR, da Cunha RV, Paniago AM, Da-Cruz AM. HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(5):692-7.

Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(2):101-12.

All-Party Parliamentary Malaria Group (APPMG). APPMG, 2008/9 – The Neglected Tropical Diseases: A challenge we could rise to – Will we? Available from: www.appmg-malaria.org.uk [2011 Feb 22].

Alphonse G, Bionda C, Aloy MT, Ardail D, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. Overcoming resistance to gamma-rays in squamous carcinoma cells by poly-drug elevation of ceramide levels. *Oncogene.* 2004;23(15):2703-15.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003– Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J. Exp Med.* 1998;187(10):1583-98.

Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96(8):4432-7.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):334-59.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77: 266-74.

Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(7):699-705.

Andersen EM, Cruz-Saldarriaga M, Llanos-Cuentas A, Luz-Cjuno M, Echevarria J, Miranda-Verastegui C, Colina O, Berman JD. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(2):133-7.

Armijos RX, Weigel MM, Calvopiña M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;91(2):153-60.

Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SR. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2009;63(9):643-9.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1269-81.

Asilian A, Jalayer T, Nilforooshzadeh M, Ghassemi RL, Peto R, Wayling S, Olliaro P, Modabber F. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine(paromomycin)ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. *Bull World Health Organ.* 2003;81(5):353-9.

Azzouz S, Maache M, Garcia RG, Osuna A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96(1):60-5.

Barral A, Pedral Sampaio D, Grimaldi GJr, Momen H, McMachon-Pratt D, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Johnson JR WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 1991;44(5):536-46.

Barral-Netto M, Roters SB, Sherlock I, Reed SG. Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes by normal human serum. Am J Trop Med Hyg. 1987;37(1):53-6.

Barreto-Bergter E, Pinto MR, Rodrigues ML. Structure and biological functions of fungal cerebroside. An Acad Bras Cienc. 2004;76(1):67-84.

Basu S, Kaufman B, Roseman S. Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. J Biol Chem. 1968;243(21):5802-4.

Basu S, Ma R, Boyle PJ, Mikulla B, Bradley M, Smith B, Basu M, Banerjee S. Apoptosis of human carcinoma cells in the presence of potential anti-cancer drugs: III. Treatment of Colo-205 and SKBR3 cells with: cis -platin, Tamoxifen, Melphalan, Betulinic acid, L-PDMP, L-PPMP, and GD3 ganglioside. Glycoconj J. 2004;20(9):563-77.

Basso AD, Mirza A, Liu G, Long BJ, Bishop WR, Kirshmeier P. The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. J Biol Chem. 2005;280(35):31101-8.

Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol. 1994;79(2):215-8.

Bathia A, Kumar R, Katare OP. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and *in vitro* evaluation. J Pharm Pharm Sci. 2004;7(2):252-9.

Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. Mol Biochem Parasitol. 2003;127(1):23-35.

Berman JD, Gallalee JV, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. Biochem Pharmacol. 1987;36(2):197-201.

Bern C, Chowdhury R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. Indian J Med Res. 2006;123:275-88.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(10): e313.

Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, Schwartz SM, Liff J, Mcgann-Maloney E, Perlman JA, Ford L. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(19):1654-62.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001;53:1-8.

Bielawska A, Linardic CM, Hannun YA. Ceramide-mediated biology. Determination of structural and stereospecific requirements through the use of N-acyl-phenylaminoalcohol analogs. *J Biol Chem.* 1992;267(26):18493-7.

Bielawska A, Greenberg MS, Perry D, Jayadev S, Shayman JA, McKay C, Hannun YA. (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J Biol Chem.* 1996;271(21):12646-54.

Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(2):158-66.

Boath A, Graf C, Lidome E, Ullrich T, Nussbaumer P, Bornancin F. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem.* 2008;283(13):8517-26.

Botelho AC, Natal D. First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):503-8.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_lta_casos_27_10_2010.pdf [21 Mar 11].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf [20 Feb 2011].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-FIOCRUZ/MINISTÉRIO DA SAÚDE). Monitoramento e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. 2011. Disponível em: <http://www4.ensp.fiocruz.br/Leishmaniose/lt/> [21 Mar 2011].

Bray PG, Barret MP, Ward SA, De Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol.* 2003;19(5):232-9.

Brener Z, Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1963;5:220-4.

Brown M, Noursadeghi M, Boyle J, Davidson RN. Successful liposomal amphotericin B treatment of *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol.* 2005;153(1):203-5.

Cabot MC, Giuliano AE, Volner A, Han TY. Tamoxifen retards glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. *FEBS Lett.* 1996;394(2):129-31.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964;6:93-100.

Chapman JV, Gouazé-Andersson V, Messner MC, Flowers M, Karimi R, Kester M, Barth BM, Liu X, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. Metabolism of short-chain ceramide by human cancer cells - implications for therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol.* 2010 Aug 1;80(3):308-15.

Chen Y, Shindler M, Simon SM. A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification. *J Biol Chem.* 1999;274(26):18364-73.

Chojnacki T, Dallner G. The biological role of dolichol. *Biochem J.* 1988;251(1):1-9.

Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, Lima Machado PR, Talhari S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):255-60.

Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(2):221-5.

Coburn C, Beverley S. Procedures for transfection of higher trypanosomatids. Boston: Harvard Medical School; 1990.

Coimbra ES, Libong D, Cojean S, Saint-Pierre-Chazalet M, Solgadi A, Le Moyec L, Duenas-Romero AM, Chaminade P, Loiseau PM. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2548-55.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castés M, Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:444-8.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003;19(11):502-8.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):399-410.

Cruz Silva MM, Madeira VM, Almeida LM, Custódio JB. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1464(1):49-61.

Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem.* 1995;230(2):460-8.

Custódio JB, Almeida LM, Madeira VM. A reliable and rapid procedure to estimate drug partitioning in biomembranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;176(3):1079-85.

Custódio JB, Dinis TC, Almeida LM, Madeira VM. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(11):1989-98.

Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: A metabolic enzyme moonlighting as a immune modulator. *PLoS Pathogens.* 2010;6(6):e1000899.

Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol.* 2004;52(2):313-27.

Desjeux P. Prevention of *Leishmania donovani* infection. *BMJ.* 2010;341:c6751.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988;141(7):2407-12.

Dujardin JC, González-Pacanowska D, Croft SL, Olesen OF, Späth GF. Collaborative actions in anti-trypanosomatid chemotherapy with partners from disease endemic areas. *Trends Parasitol.* 2010; 26(8):395-403.

El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *Int J Pharm.* 2001;215:229-40.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005;15;309(5733):404-9.

El-Sayed M, Anwar AE. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(3):335-40.

Faust JR, Goldstein JL, Brown MS. Squalene synthetase activity in human fibroblasts: regulation via the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979;76(10):5018-22.

Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DC, Solomon AW. Neglected Tropical diseases. *Brit Med Bull.* 2010;93:179-200.

Figueiredo JM, Dias WB, Mendonça-Previato L, Previato JO, Heise N. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 2005;387(Pt 2):519-29.

Figueiredo JM. Caracterização molecular e funcional da ceramida sintase dependente de acil-CoA em *Trypanosoma cruzi*. [tese (Doutorado em Ciências)]. Rio de Janeiro (Brasil): Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:755-9.

Franke ED, Lucas CM, Tovar AA, Kruger JH, De Rivera MV, Wignall FS. Diffuse cutaneous leishmaniasis acquired in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;43:260-2.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. Res Microbiol. 2004;155(4):224-30.

Ginger ML, Chance ML, Sadler IH, Goad LJ. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the trypanosomatid *Leishmania mexicana*. J Biol Chem. 2001;276(15):11674-82.

Gelmann EP. Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. Semin Oncol. 1997;24(1 Suppl 1):S1-65-S1-70.

Genestra M, Soares-Bezerra RJ, Gomes-Silva L, Fabrino DL, Bellato-Santos T, Castro-Pinto DB, Canto-Cavaleiro MM, Leon LL. In vitro sodium nitroprusside-mediated toxicity towards *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. Cell Biochem Funct. 2008;26(6):709-17.

Goldstein SR. Selective estrogen receptor modulators: a new category of compounds to extend postmenopausal women's health. Int J Fertil Womens Med. 1999;44(5):221-6.

Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe LJR. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. Hum Reprod Update. 2000;6(3):212-24.

Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RC, Cardoso JE, de Oliveira-Silva F, Maciel FC, Rabello A, Ferreira LA. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Acta Trop. 2005;93(2):161-7.

Grimaldi GJR. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;77(2):195-215.

Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(3): e980.

Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. Nature. 2003;426(6968):803-9.

Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):229-43.

Handman E, Kedzierski L, Uboldi AD, Goding JW. Fishing for anti-leishmania drugs: principles and problems. Adv Exp Med Biol. 2008;625:48-60.

Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):139-50.

Harper MJ, Walpole AL. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature.* 1996;212(5057):87.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1474-81.

Hernandez Y, Shpak M, Duarte TT, Mendez TL, Maldonado RA, Roychowdhury S, Rodrigues ML, Das S. Novel role of sphingolipid synthesis genes in regulating giardial encystation. *Infect Immun.* 2008;76(7):2939-49.

Herwaldt B. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354:1191-9.

Hiraoka M, Abe A, Shayman JA. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10090-9.

Hotez P, Ferris M. The antipoverty vaccines. *Vaccine.* 2006;24:5787-99.

Hotez P. The Giant Anteater in the Room: Brazil's Neglected Tropical Diseases Problem. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(1):e177.

Hotez P, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet.* 2009;373:1570-5.

Hsu FF, Turk J, Zhang K, Beverley SM. Characterization of inositol phosphorylceramides from *Leishmania major* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007;18(9):1591-604.

Ichikawa S, Nakajo N, Sakiyama H, Hirabayashi Y. A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2703-7.

Iraji F, Sadeghinia A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005;99(1):3-9.

Jordan VC. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. *J Med Chem.* 2003;46(6):883-908.

Jordan VC. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids.* 2007;72(13):829-42.

Jordan VC. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer.* 2008;44(1):30-8.

Kahl LP, McMahon-Pratt D. Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *J Immunol.* 1987;138(5):1587-95.

Kalil SP. Caracterização funcional das proteínas LRR17 em *Leishmania (Leishmania) major*. [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Kayser O, Kiderlen AF, Bertels S, Siems K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):288-92.

Kaneshiro ES, Jayasimhulu K, Lester RL. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid. *J Lipid Res.* 1986;27(12):1294-303.

Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 2006;133 (Suppl):S87-112.

Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem.* 2009;16(5):599-614.

Kovács P, Pintér M, Csaba G. Effect of glucosphingolipid synthesis inhibitor (PPMP and PDMP) treatment on *Tetrahymena pyriformis*: data on the evolution of the signaling system. *Cell Biochem Funct.* 2000;18(4):269-80.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:811-82.

Landfear SM. Drugs and transporters in kinetoplastid protozoa. Adv Exp Med Biol. 2008;625:22-32.

Landoni M, Duschak VG, Erra-Balsells R, Couto AS. UV-MALDI mass spectrometry analysis of NBD-glycosphingolipids without an external matrix. J Am Soc Mass Spectrom. 2008;19(7):923-6.

Lapa e Silva JR. Doenças Negligenciadas: Doenças Micobacterianas. Gaz méd Bahia. 2008;78(Supl. 1):80-5.

Lauer SA, Chatterjee S, Haldar K. Uptake and hydrolysis of sphingomyelin analogues in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. Mol Biochem Parasitol. 2001;115(2):275-81.

Lavie Y, Cao H, Volner A, Lucci A, Han TY, Geffen V, Giuliano AE, Cabot MC. Agents that reverse multidrug resistance, tamoxifen, verapamil, and cyclosporin A, block glycosphingolipid metabolism by inhibiting ceramide glycosylation in human cancer cells. J Biol Chem. 1997;272(3):1682-7.

Lester RL, Dickson RC. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. Adv Lipid Res. 1993;26:253-74.

Liu B, Liu Y, Motyka AS, Agbo EE, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends Parasitol. 2005;21(8):363-8.

Lightburn E, Morand JJ, Meynard JB, Kraemer P, Chaudier B, Pages F, Garnotel E, Patte JH, Banzet S, Dampierre H, Lepage J, Morillon M, Boutin JP, Hovette P, Chouc C. Management of American cutaneous leishmaniasis. Outcome apropos of 326 cases treated with high-dose pentamidine isethionate. Med Trop (Mars). 2003;63(1):35-44.

Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. Parasitol Today. 1997;13(2):80-2.

Lima TM, Amarante-Mendes GP, Curi R. Docosahexaenoic acid enhances the toxic effect of imatinib on Bcr-Abl expressing HL-60 cells. Toxicol In Vitro. 2007;21(8):1678-85.

Lipsky NG, Pagano RE. Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: endogenously synthesized sphingomyelin and glucocerebroside analogues pass through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 1985;100(1):27-34.

Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva, Sacks D. Evidence that the high incidence of treatment failure in kala-azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999;180:564-7.

Lloyd-Smith JO, Poss M, Grenfell BT. HIV-1/parasite co-infection and the emergence of new parasite strains. *Parasitology.* 2008;135(7):795-806.

Loo SA, Lesoon-Wood LA, Cooney RV. Effects of tamoxifen on nitric oxide synthesis and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 fibroblasts. *Cancer Lett.* 1998;122(1-2):67-75.

Lopez-Lluch G, Barroso MP, Martin SF, Fernandez-Ayala DJ, Gomez-Diaz C, Villalba JM, Navas P. Role of plasma membrane coenzyme Q on the regulation of apoptosis. *Biofactors.* 1999;(2-4):171-7.

Löw P, Dallner G, Mayor S, Cohen S, Chait BT, Menon AK. The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues. *J Biol Chem.* 1991;266(29):19250-7.

Luxo C, Jurado AS, Madeira VM, Silva MT. Tamoxifen induces ultrastructural alterations in membranes of *Bacillus stearothermophilus*. *Toxicol In Vitro.* 2003;17(5-6):623-8.

Maceyka M, Machamer CE. Ceramide accumulation uncovers a cycling pathway for the cis-Golgi network marker, infectious bronchitis virus M protein. *J Cell Biol.* 1997;139(6):1411-8.

Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP, Mauad MS, Colturato VR. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT Center. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(6):309-24.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):e912.

Makino A, Ishii K, Murate M, Hayakawa T, Suzuki Y, Suzuki M, Ito K, Fujisawa T, Matsuo H, Ishitsuka R, Kobayashi T. D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters

cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains. *Biochemistry*. 2006;45(14):4530-41.

Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2001;(6):469-77.

Marsden PD. Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ*. 1990;301(6753): 656-7.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000; 16(5):188-9.

Merril Jr, Sandhoff K. Sphingolipids: Metabolism and cell signaling. In: Vance De, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 373-406.

Mina JG, Mosely JA, Ali HZ, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Steel PG, Denny PW. A plate-based assay system for analyses and screening of the *Leishmania major* inositol phosphorylceramide synthase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(9):1553-61.

Mina JG, Mosely JA, Ali HZ, Denny PW, Steel PG. Exploring *Leishmania major* inositol phosphorylceramide synthase (LmjIPCS): insights into the ceramide binding domain. *Org Biomol Chem*. 2011;9(6):1823-30.

Miranda-Verástegui C, Llanos-Cuentas A, Arévalo I, Ward BJ, Matlashewski G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 2005;40(10):1395-403.

Miziorko HM. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(2):131-43.

Modabber F, Buffet PA, Torreele E, Milon G, Croft SL. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2007;6:3.

Moosa-Kazemi SH, Yaghoobi-Ershadir MR, Akhavan AA, Abdoli H, Zahraei-Ramazani AR, Jafari R, Houshmand B, Nadim A, Hosseini M. Deltamethrin-impregnated bed nets and curtains in an anthroponotic cutaneous leishmaniasis control program in northeastern Iran. *Ann Saudi Med*. 2007;27(1):6-12.

Moreira ME, Del Portillo HA, Milder RV, Balanco JM, Barcinski MA. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol*. 1996;167(2):305-13.

Morel CM, Acharya T, Broun D, Dangi A, Elias C, Ganguly NK, Gardner CA, Gupta RK, Haycock J, Heher AD, Hotez PJ, Kettler HE, Keusch GT, Krattiger AF, Kreutz FT, Lall S, Lee K, Mahoney R, Martinez-Palomo A, Mashelkar RA, Matlin SA, Mzimba M, Oehler J, Ridley RG, Senanayake P, Singer P, Yun M. Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. *Science*. 2005;309:401-4.

Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. SERMs: current status and future trends. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;43(1):63-76.

Motta JOC, Sampaio RNR. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011. In Press.

Muchmore DB. Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects. *Oncologist*. 2000;5(5):388-92.

Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA, Bonventre PF. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science*. 1985;229:1099-101.

Murray HW. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(8):2185-97.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-77.

Murta SM, Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*. 1998;116:165-71.

Nascimento ET, Moura ML, Queiroz JW, Barroso AW, Araujo AF, Rego EF, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SM. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011. In Press.

Navas P, Fernandez-Ayala DM, Martin SF, Lopez-Lluch G, De Caboa R, Rodriguez-Aguilera JC, Villalba JM. Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by coenzyme Q from plasma membrane in serum-deprived cells. *Free Radic Res*. 2002;36(4):369-74.

Neumann A, Baginski M, Czub J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(51):18266-72.

Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(8):604-16.

Oliveira MC, Amorim RF, Freitas RA, Costa LA. A fatal case of mucocutaneous leishmaniasis after pentavalent antimonial use. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3):258-60.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):293-305.

Pan American Health Organization (PAHO). PAHO/WHO, 2007 – Health in the Americas, vol I, Regional. Available from: <http://www.paho.org/hia/index.html> [2011 Mar 21].

Pandey BD, Pun SB, Kaneko O, Pandey K, Hirayama K. Case report: Expansion of visceral leishmaniasis to the western hilly part of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(1):107-8.

Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28220-8.

Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med*. 2002;8(2):82-8.

Pattingre S, Bauvy C, Levade T, Levine B, Codogno P. Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy*. 2009;5(4):558-60.

Pérez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(8):2397-403.

Picado A, Singh SP, Rijal S, Sundar S, Ostyn B, Chappuis F, Uranw S, Gidwani K, Khanal B, Rai M, Paudel IS, Das ML, Kumar R, Srivastava P, Dujardin JC, Vanlerberghe V, Andersen EW, Davies CR, Boelaert M. Longlasting insecticidal nets for prevention of *Leishmania donovani* infection in India and Nepal: paired cluster randomised trial. *BMJ*. 2010;341:c6760.

Radin NS, Shayman JA, Inokuchi J. Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. *Adv Lipid Res*. 1993;26:183-213.

Rasmussen JA, Hermetter A. Chemical synthesis of fluorescent glycerol- and sphingolipids. *Prog Lipid Res*. 2008;47(6):436-60.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Roberts LS, Janovy Jr. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.

Rouanet P, Linares-Cruz G, Dravet F, Poujol S, Gourgou S, Simony-Lafontaine J, Grenier J, Kramar A, Girault J, Le Nestour E, Maudelonde T. Neoadjuvant percutaneous 4-hydroxytamoxifen decreases breast tumoral cell proliferation: a prospective controlled randomized study comparing three doses of 4-hydroxytamoxifen gel to oral tamoxifen. J Clin Oncol. 2005;23(13):2980-7.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001;55:453-83.

Santa Cruz AR, Medrano EE, Baldi A. Dolichol-sugar derivative synthesis in human breast cancer cell line (T47D). Effects of estrogens and antiestrogens. Biochem Biophys Res Commun. 1985;126(1):382-8.

Santos MA, Marques RC, Farias CA, Vasconcelos DM, Stewart JM, Costa DL, Costa CH. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(6):629-33.

Schmelz EM, Dombrink-Kurtzman MA, Roberts PC, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Merrill AH Jr. Induction of apoptosis by fumonisin B1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. Toxicol Appl Pharmacol. 1998;148(2):252-60.
Serapovic D, Kelekar A, Nayak AK, Tarca AL, Hanada K, Pierce JS, Bielawski J. Increased ceramide accumulation correlates with downregulation of the autophagy protein ATG-7 in MCF-7 cells sensitized to photodamage. Arch Biochem Biophys. 2010;494(1):101-5.

Sereno D, Holzmuller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(7):2064-9.

Sharief AH, Gasim Khalil EA, Theander TG, Kharazmi A, Omer SA, Ibrahim ME. *Leishmania donovani*: an in vitro study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. Exp Parasitol. 2006;114(4):247-52.

Shayman JA. Sphingolipids. Kidney Int. 2000;58(1):11-26.

Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol.* 1953;20:191-207.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother.* 2004;10(6):307-15.

Sonda S, Stefanic S, Hehl AB. A sphingolipid inhibitor induces a cytokinesis arrest and blocks stage differentiation in *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):563-9.

Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ, Ruddle NH, Flavell RA, McMahon-Pratt D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 1997;158:5374-83.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1266-72.

Soto-Mancipe J, Grogl M, Berman JD. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Clin Infect Dis.* 1993;16(3):417-25.

Straus AH, Valero VB, Takizawa CM, Lavery SB, Toledo MS, Suzuki E, Salyan ME, Hakomori S, Barbieri CL, Takahashi HK. Glycosphingolipid antigens from *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes. Binding of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies *in vitro* and *in vivo*. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30(3):395-9.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1301-10.

Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard P, Murray HW. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.* 1998;352(9143):1821-3.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001;6:849-54.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 2010;362(6):504-12.

Suzuki E, Tanaka AK, Toledo MS, Lavery SB, Straus AH, Takahashi HK. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(3):362-9.

Tanaka AK, Valero VB, Takahashi HK, Straus AH. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(3):487-92.

Taras TL, Wurz GT, DeGregorio MW. *In vitro* and *in vivo* biologic effects of Ospemifene (FC-1271a) in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;77(4-5):271-9.

Tempone AG, Martins de Oliveira C, Berlinck RG. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. *Planta Med.* 2011. In Press.

Thakur CP, Kanyok TP, Pandey AK, Sinha GP, Zaniewski AE, Houlihan HH, Olliaro P. A prospective randomized, comparative, open-label trial of the safety and efficacy of paromomycin (aminosidine) plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone for the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(4):429-31.

Thakur CP, Kumar M, Pandey AK. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45(4):435-41.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2008;47(2):109-24.

Uliana SR, Goyal N, Freymüller E, Smith DF. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol.* 1999;92(3):183-91.

van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(3):184-94.

Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. [Glycobiology](#).1993;3(2):97-130.

Veloza D, Cabral A, Ribeiro MC, Motta JO, Costa IM, Sampaio RN. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An Bras Dermatol.* 2006;81(3):255-9.

Vioukov VN. Control of transmission. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in Biology and Medicine.* London: Academic Press; 1987. p. 909-28.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem.* 1991;266(22):14486-90.

Wang H, Charles AG, Frankel AJ, Cabot MC. Increasing intracellular ceramide: an approach that enhances the cytotoxic response in prostate cancer cells. *Urology*. 2003;61(5):1047-52.

Wasunna MK, Rashid JR, Mbui J, Kirigi G, Kinoti D, Lodenyo H, Felton JM, Sabin AJ, Albert MJ, Horton J. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(5):871-6.

Wiseman H, Cannon M, Arnstein HR, Halliwell B. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes. Similarity to cholesterol and ergosterol. *FEBS Lett*. 1990;274(1-2):107-10.

Wiseman H, Smith C, Arnstein HR, Halliwell B, Cannon M. The antioxidant action of ketoconazole and related azoles: comparison with tamoxifen and cholesterol. *Chem Biol Interact*. 1991;79(2):229-43.

Wiseman H, Cannon M, Arnstein HR, Barlow DJ. The structural mimicry of membrane sterols by tamoxifen: evidence from cholesterol coefficients and molecular-modelling for its action as a membrane anti-oxidant and an anti-cancer agent. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1138(3):197-202.

Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003;31(3):174-7.

World Health Organization (WHO). WHO, 2010 – First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/index.html [2011 Mar 21].

World Health Organization (WHO). 2011. Leishmaniasis and HIV Coinfection. Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html [2011 Apr 05].

Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill A. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1028-33.

Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adai V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis*. 2006;194(8):1168-75.

Zamboni DS, Rabinovitch M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun*. 2003;71(3):1225-33.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health*. 2010;15(1):68-76.

Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J*. 2003;22(22):6016-26.

Zhang K, Pompey JM, Hsu FF, Key P, Bandhuvula P, Saba JD, Turk J, Beverley SM. Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. *EMBO J*. 2007;26(4):1094-104.

Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;170(2):55-64.

Zhang O, Wilson MC, Xu W, Hsu FF, Turk J, Kuhlmann FM, Wang Y, Soong L, Key P, Beverley SM, Zhang K. Degradation of host sphingomyelin is essential for *Leishmania* virulence. *PLoS Pathog*. 2009;5(12):e1000692.