

Silvia Patrícia Ribeiro Dias

Inibidores das DNA Topoisomerasas como novos alvos terapêuticos para o *Trypanosoma brucei* (Doença do Sono)

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

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sílvia Patrícia Ribeiro Dias, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010114909, 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 ou 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, 11 de Julho de 2014

(Sílvia Patrícia Ribeiro Dias)

A tutora:

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa)

A aluna:

(Sílvia Patrícia Ribeiro Dias)

Agradecimentos

Pela disponibilidade, amabilidade, ajuda e simpatia demonstradas durante o desenvolvimento desta tese, o meu agradecimento particular para com a minha tutora da monografia, Professora Dr.^a Maria do Céu Rodrigues de Sousa! Obrigado por me ter mostrado o caminho a seguir em cada dúvida e dificuldade, obrigado pelo apoio prestado e pela paciência no decurso deste trabalho.

À minha família pela oportunidade, pelo amor, pela dedicação e por estarem do meu lado. Um Muito Obrigado especial à minha mãe, a pessoa que sempre me apoiou e ajudou em tudo na vida, e que sempre acreditou nas minhas opções e incentivou os meus objetivos.

Agradeço também à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos aqueles que de um modo ou de outro, contribuíram para o sucesso do meu trabalho e se cruzaram comigo durante esta viagem de cinco anos, nos bancos da faculdade e também fora deles.

Obrigado por TUDO a todos!

Abreviaturas

ANT – Antraciclina

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOX – Doxorrubicina

ED₅₀ – Dose efetiva 50%

HAPTI – Transportador de Pentamidina de elevada afinidade

HAT – Tripanossomíase Africana Humana

HL – 60 – Células de Leucemia Promielocítica Humana

IG M – Imunoglobulinas M

IM – Intramuscular

IV – Intravenosa

kDNA – Cinetoplasto/DNA mitocondrial

LAPTI – Transportador de Pentamidina de baixa afinidade

LCR – Líquido Cefalorraquídeo

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MT – Mitocondrial

NECT – Terapêutica de Combinação Nifurtimox-Eflornitina

ODC – Ornitina Descarboxilase

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA i – RNA de Interferência

SNC – Sistema Nervoso Central

TOPO – DNA Topoisomerase

VSG – Variant Surface Glycoproteins

Índice

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX
1. Introdução.....	I
1.1. Panorama geral de mortalidade e morbidade devido a parasitas.....	I
2. Tripanossomíase Africana Humana	I
2.1. Perspetiva etiológica e epidemiológica da doença do sono	I
2.2. Ciclo de vida de <i>Trypanossoma brucei</i>	3
2.3. Fisiopatologia e diagnóstico da HAT	4
2.4. Tratamento da HAT e medidas de prevenção	5
3. <i>Drug Discovery</i> na Tripanossomíase Africana Humana	10
3.1. Maquinaria genética de <i>Trypanossoma brucei</i> - Cinetoplasto	10
3.2. Importância das DNA Topoisomerasas no parasita	11
3.2.1. DNA Topoisomerasas I	12
3.2.2. DNA Topoisomerasas II	14
3.3. Inibidores das DNA Topoisomerasas - Novos fármacos anti-tripanosomais	16
4. Conclusão.....	20
5. Bibliografia.....	21

Índice de Figuras

Figura 1 – Desenho esquemático do tripomastigota de <i>Trypanossoma brucei</i> ⁽⁷⁾	2
Figura 2 – Distribuição geográfica do <i>T.b.gambiense</i> e <i>T.b.rhodesiense</i> no continente africano ⁽¹²⁾	3
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Trypanossoma brucei</i> ⁽¹³⁾	3
Figura 4 – Estrutura molecular dos fármacos atualmente usados na HAT ⁽¹⁶⁾	5
Figura 5 – Replicação dos minicírculos do kDNA ⁽¹⁸⁾	11
Figura 6 – Ação das DNA topoisomerases I e II ⁽²³⁾	12
Figura 7 – Domínios das TOPO IB ⁽²⁴⁾	14
Figura 8 – Domínios das TOPO II ⁽²¹⁾	15
Figura 9 – Cinética da perda de kDNA durante TB TOPO II mt RNAi ⁽¹⁹⁾	15
Figura 10 – Estrutura da Doxo e Daunorrubicina ⁽²⁶⁾	18
Figura 11 – Estrutura da Aclarubicina ⁽²⁸⁾	18
Figura 12 – Estrutura da Mitoxantrona ⁽²⁹⁾	19
Figura 13 – Mecanismo de Inibição das TOPO ⁽³⁰⁾	19

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Limites para a definição das categorias de risco da doença do sono ⁽¹¹⁾	2
Tabela 2 – Modo de administração e posologias dos fármacos usados na HAT ⁽⁴⁾	9
Tabela 3 – Alvos terapêuticos para desenvolvimento de fármacos anti-HAT ⁽¹⁴⁾	10
Tabela 4 – Atividade dos inibidores das DNA Topoisomerases nas formas sanguíneas do <i>Trypanossoma brucei</i> ⁽²⁰⁾	16
Tabela 5 – Seletividade dos inibidores das DNA Topoisomerases ⁽²⁰⁾	17

Resumo

A doença do sono, descoberta no século XIX, é uma infecção causada pelo parasita *Trypanossoma brucei* e que é transmitida aos humanos através da picada de várias espécies de dípteros infetados do género *Glossina spp* (mosca Tsé-tsé). Tem vindo a tornar-se um problema de saúde pública cada vez mais emergente pelo facto de ao longo do tempo se ter dissipado para zonas do globo onde não seria de esperar a patologia, nomeadamente para zonas desenvolvidas como a Europa Ocidental e a América do Norte.

Esta doença, causadora de alterações a nível neurológico, apresenta opções terapêuticas de administração complexa e prolongada, necessitando de recursos médicos raramente disponíveis em países de sub-mundo o que diminui a adesão à terapêutica e fomenta um curso negativo da doença, muitas vezes causador de morte. Assim, e dado que as resistências aos fármacos atualmente existentes (suramina, pentamidina, eflornitina, melarsoprol) também têm vindo a aumentar torna-se fundamental o desenvolvimento de novas opções terapêuticas anti-HAT.

O avanço tecnológico e científico permitiu aumentar o conhecimento acerca da biologia do parasita e como tal novos alvos têm surgido, nomeadamente as DNA Topoisomerasas. Dado que estas enzimas são fundamentais para a replicação do genoma, e como tal para a sobrevivência do parasita, a utilização de inibidores das mesmas como medicamentos anti-HAT poderá ser uma hipótese futura, que deverá ser devidamente avaliada. Deste modo, a avaliação *in vivo* de inibidores promissores já existentes como as antraciclinas, usadas em patologias oncológicas, torna-se fundamental para determinação da eficácia e toxicidade, poupando-se ainda tempo e dinheiro no desenvolvimento de novas moléculas.

Palavras-Chave: Doença do Sono; *Trypanossoma brucei*; kDNA; DNA Topoisomerasas; Antraciclinas.

Abstract

Sleeping sickness, discovered in the nineteenth century, is an infection caused by the parasite *Trypanosoma brucei* and is transmitted to humans through the bite of some species of infected flies of the genus *Glossina spp* (Tsé-tsé fly). This disease has become a major public health problem, by the fact that over time has dissipated to parts of the globe which would not be expected, particularly for developed areas such as Western Europe and North America.

This disease, which causes neurological changes, presents therapeutic options of complex and prolonged administration, requiring medical resources rarely available in the sub-world countries, which decreases the adherence and propel a negative course of the disease often causing death. Thus, given that the resistance to currently available drugs (suramin, pentamidine, eflornithine, melarsoprol) have also been increasing, becomes essential to develop new therapeutic options anti-HAT.

The technological and scientific advances helped increase the knowledge of the parasite biology, and due to that new targets have emerged such as DNA Topoisomerases. Given that these enzymes are essential for the replication of the genome, such as for parasite survival, the use of such inhibitors as anti-HAT drugs could be a future event which should be properly evaluated. Thus, the in vivo evaluation of promising inhibitors as anthracyclines, used in oncological pathologies, becomes crucial for determining the efficacy and toxicity, saving time and money in new molecules development.

Keywords: Sleeping Sickness; *Trypanosoma brucei*; kDNA; DNA Topoisomerases; anthracyclines.

I. Introdução

I.1. Panorama geral de mortalidade e morbidade devido a parasitas

Os parasitas são uma causa bastante frequente de doença a nível humano e também animal, quer em países pobres quer nos mais desenvolvidos. Alguns dos parasitas causam milhares de mortes, levam a enormes gastos na saúde, causam grande impacto veterinário e são das principais causas de morbidade nos países subdesenvolvidos. O combate às parasitoses tem tido taxas de sucesso bastante variáveis, uma vez que os parasitas apresentam diferenças significativas na sua transmissão, o que condiciona a disseminação. No caso das parasitoses intestinais, estas estão associadas essencialmente a condições sanitárias e higiénicas precárias, uma vez que a transmissão se dá principalmente por via fecal-oral, surgindo maioritariamente nos países subdesenvolvidos. Assim, têm sido das parasitoses que mais se têm tentado diminuir com a implementação de medidas de higiene e de saneamento adequado, bem como através de ações de sensibilização para comportamentos adequados ⁽¹⁾.

Geralmente as parasitoses que envolvem no seu ciclo um vetor de transmissão apresentam uma distribuição geográfica restrita, que normalmente é condicionada pelo habitat requerido pelo mesmo. No entanto, a evolução dos transportes e facilidade de deslocação das pessoas e de alimentos por longas distâncias tornou mais frequente o aparecimento destas doenças em regiões onde não surgiriam normalmente, uma vez que o vetor infetado viaja conjuntamente. Surgem então, quer na Europa, quer a nível da América do Norte casos de parasitoses que seriam de esperar apenas em países tropicais, tal como a malária e a doença do sono ⁽¹⁾. Tendo em conta estes conhecimentos acerca das doenças parasitárias e analisando a sua evolução, torna-se fundamental tentar desenvolver fármacos que as consigam controlar, uma vez que os existentes atualmente apresentam bastantes limitações.

2. Tripanossomíase Africana Humana

2.1. Perspetiva etiológica e epidemiológica da doença do sono

A doença do sono, Tripanossomose ou Tripanossomíase Africana Humana – HAT, é uma patologia que foi descrita por exploradores europeus no fim do século XIX, início do século XX ⁽²⁾ e que é devida à infeção causada pelo parasita *Trypanosoma brucei* (*T.brucei*), também causador da Nagana a nível animal, sendo transmitida aos humanos através da picada de várias espécies de dípteros infetados do género *Glossina spp* (mosca Tsé-tsé), sendo

estes picadores de dia ⁽³⁾ ⁽⁴⁾. *T.brucei* é um protozoário do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora (flagelados), ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e género *Trypanossoma*. Este parasita, eucariota unicelular, possui corpo alongado e caracteriza-se por apresentar núcleo central, mitocôndria com cinetoplasto (DNA mitocondrial), reprodução assexuada por fissão binária e flagelo que lhe confere mobilidade (Fig.1) ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾. A transmissão pode também suceder por transmissão vertical, por contacto com sangue contaminado, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e por contacto sexual ⁽⁸⁾.

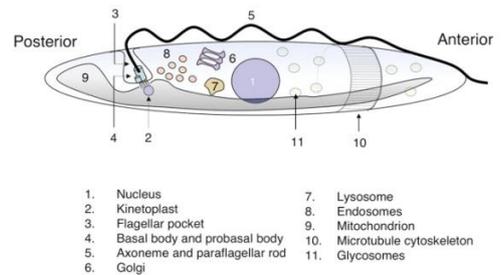


Figura 1 – Desenho esquemático do tripomastigota de *Trypanossoma brucei* ⁽⁷⁾

A nível epidemiológico a HAT é endêmica, existindo em 36 países da África Sub-Saariana. A doença caracteriza-se por apresentar prevalências bastante díspares de país para país, e até de variar significativamente dentro do mesmo. O número atual de casos é estimado entre 50-70 000, que se poderão tornar fatais na ausência de tratamento adequado ⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾. Estima-se que atualmente a população em risco seja de 70 milhões, distribuída por 1,55 milhões de km², estando mais em risco as populações rurais (agricultores, pescadores) devido à maior exposição à mosca Tsé-tsé. Vinte e um milhões de pessoas vivem em áreas classificadas com risco moderado a elevado, em que mais de um caso por 10 000 habitantes é detetado por ano, enquanto os restantes 50 milhões vivem em zonas de risco baixo ou muito baixo (Tabela 1). O país mais afetado é a República Democrática do Congo, responsável por 70% dos casos reportados nos últimos 10 anos e por 83% dos casos de 2012. É ainda o país que apresenta o maior número de pessoas (36,2 milhões) e de área de risco (790 milhares de km²), tendo mais de mil novos casos reportados anualmente ⁽¹⁰⁾ ⁽¹¹⁾.

Tabela 1 – Limites para a definição das categorias de risco da doença do sono ⁽¹¹⁾

Category of risk	$\hat{R}_t(s)$	HAT cases per annum
Very high	$\geq 10^{-2}$	≥ 1 per 10^2 people
High	$10^{-3} \leq R < 10^{-2}$	≥ 1 per 10^3 people AND < 1 per 10^2 people
Moderate	$10^{-4} \leq R < 10^{-3}$	≥ 1 per 10^4 people AND < 1 per 10^3 people
Low	$10^{-5} \leq R < 10^{-4}$	≥ 1 per 10^5 people AND < 1 per 10^4 people
Very low	$10^{-6} \leq R < 10^{-5}$	≥ 1 per 10^6 people AND < 1 per 10^5 people

A HAT apresenta duas formas clínicas dependendo da subespécie envolvida, *Trypanossoma brucei gambiense* e *Trypanossoma brucei rhodesiense*, sendo as duas

indistinguíveis morfológicamente, mas não sobreponíveis a nível de distribuição geográfica, exceto no Uganda (Fig.2) ⁽³⁾.

O *T.b.gambiense* é encontrado em 24 países da África Central Ocidental e é responsável por 98 % dos casos da doença. Normalmente é responsável por infecção crónica, em que as pessoas infetadas podem permanecer durante meses ou anos assintomáticas e sem sinais da patologia. No entanto, quando surgem as manifestações o doente já está em estágios avançados e com comprometimentos graves das funções orgânicas ⁽⁴⁾. Este parasita tem como principal reservatório o homem e geralmente multiplica-se nas margens dos rios. Apresenta uma população de risco de cerca de 57 milhões distribuídos por 1,38 milhões de km², sendo que 19,6 milhões encontram-se em risco moderado ou elevado, enquanto 37,4 milhões estão nas zonas de risco baixo ou muito baixo ^{(10) (11)}.

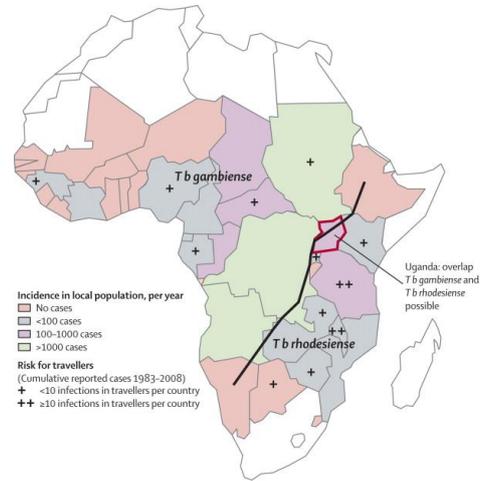


Figura 2 – Distribuição geográfica do *T.b.gambiense* e *T.b.rhodesiense* no continente africano ⁽¹²⁾

T.b.rhodesiense por sua vez encontra-se em 13 países da África Sul Oriental. É normalmente responsável por infecção aguda, surgindo os primeiros sinais e sintomas nas primeiras semanas ou meses após-picada, com uma rápida evolução da doença ⁽⁴⁾. Este parasita tem como principais reservatórios os animais de caça (antílope, búfalo) e alguns domésticos e o vetor biológico multiplica-se nas savanas ⁽¹⁰⁾. A população de risco é estimada em 12,3 milhões, distribuída por 170 mil km². Desta, 1,4 milhões vive nas áreas de risco moderado ou elevado e 10,9 milhões encontra-se na de risco baixo ou muito baixo ⁽¹¹⁾.

2.2. Ciclo de vida de *Trypanossoma brucei*

T.brucei tem um ciclo de vida heteroxeno, uma vez que apresenta mais do que um hospedeiro (Fig.3). Quando uma mosca Tsé-tsé (*Glossina spp*) infectada pica o homem ou outros mamíferos, injecta tripomastigotas metacíclicos que vão para os vasos sanguíneos e linfa. Aquando da chegada à corrente sanguínea transformam-se em

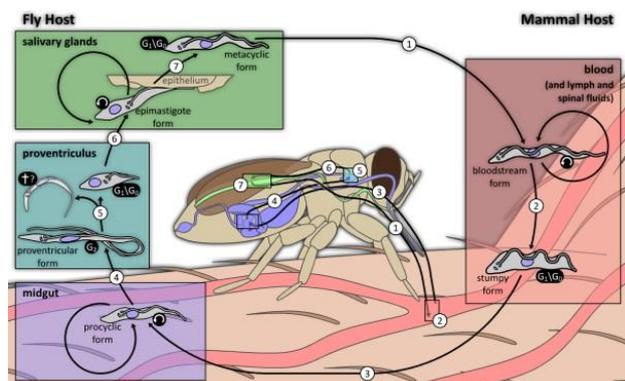


Figura 3 – Ciclo de vida de *Trypanossoma brucei* ⁽¹³⁾

tripomastigotas sanguíneos, sendo depois distribuídos pelo resto do corpo, replicando-se por fissão binária. A *Glossina*, por sua vez, infeta-se quando pica o hospedeiro e retira sangue contaminado com tripomastigotas sanguíneos. Estes no intestino convertem-se em tripomastigotas procíclicos, e depois ao abandonarem o intestino transformam-se em epimastigotas. Os epimastigotas nas glândulas salivares multiplicam-se por divisão binária e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Este ciclo demora aproximadamente três semanas na mosca Tsé-tsé, período a partir do qual estão criadas as condições para infetar o homem ⁽³⁾ ⁽⁶⁾.

2.3. Fisiopatologia e diagnóstico da HAT

Após a picada da mosca Tsé-tsé pode ocorrer uma lesão edematosa vermelha na pele a nível do local da picada, conhecido por cancro tripanossómico, comum aquando de infeção por *T.b.rhodesiense* e rara com *T.b.gambiense*. A HAT apresenta uma evolução clínica que compreende duas etapas, a primeira corresponde à fase hemolinfática e a segunda à meningoencefálica. A hemolinfática surge semanas a meses após-picada e deteta-se a presença do parasita no sangue e linfa. Aparecem diversos sinais e sintomas tais como febre, fadiga, anemia, perda peso, dor articular, muscular e de cabeça, *rash* cutâneo, trombocitopenia, esplenomegalia e o típico edema dos nódulos linfáticos (Sinal de Winterbottom) ⁽³⁾ ⁽⁵⁾. A meningoencefálica surge quando o parasita transpõe a barreira hematoencefálica invadindo o sistema nervoso central (SNC), sendo esta a etapa mais grave e fatal. É nesta fase neurológica que surgem os sinais mais indicativos da doença tais como mudança de comportamento, alteração da personalidade, alteração do ciclo do sono, distúrbios sensoriais, alterações na coordenação, confusão, coma e morte.

A velocidade de progressão da doença depende da subespécie envolvida. Tal como referido anteriormente, *T.b.rhodesiense* é responsável por uma resposta aguda, ou seja, que apresenta rápida progressão e um curto período assintomático. Em poucas semanas o parasita invade o SNC causando problemas neurológicos e em poucos meses poderá levar à morte. A subespécie *T.b.gambiense* causa a forma crónica em que há uma evolução lenta e um longo período assintomático, aparecendo os sintomas apenas anos após-infeção. Na ausência de tratamento ocorre morte, em média 6/7 anos na infeção por *T.b.gambiense*, podendo matar em menos de um ano na infeção por *T.b.rhodesiense*⁽³⁾.

O diagnóstico da doença é feito inicialmente com base nos sinais clínicos e através de métodos serológicos/imunológicos. Os testes serológicos, apenas existentes para *T.b.gambiense*, envolvem a pesquisa de anticorpos, nomeadamente de Imunoglobulina M e

de hipergamaglobulinemia no nível do líquido cefalorraquídeo (LCR) e sangue recorrendo-se a técnicas de imunofluorescência ⁽⁴⁾ ⁽¹⁰⁾.

O diagnóstico laboratorial também engloba a identificação do parasita nos fluidos ou tecidos corporais, nomeadamente em aspirado de gânglios linfáticos e de medula óssea e LCR. Normalmente recorre-se a um exame direto a fresco e após coloração de Giemsa e exame após concentração por tripla centrifugação. Há que ter em atenção que o *T.b.rhodesiense* apresenta elevadas parasitémias ao contrário do *T.b.gambiense*, daí a deteção do parasita no sangue ser mais fácil no primeiro do que no segundo ⁽⁴⁾ ⁽¹⁰⁾.

O estado de progressão da doença é analisado recorrendo-se ao exame do LCR, obtido por punção lombar, para avaliar o envolvimento e extensão afetada do SNC. Em função dos resultados desta avaliação será determinado o curso do tratamento, uma vez que os fármacos utilizados dependerão do estágio em que a doença se encontra e do comprometimento neurológico. Uma vez que a medicação existente para a fase meningoencefálica é mais complexa e de maior risco, torna-se fundamental identificar os doentes o mais cedo possível de modo a poder tratá-los em estadios menos severos ⁽⁴⁾ ⁽¹⁰⁾.

2.4. Tratamento da HAT e medidas de prevenção

Todos os portadores de HAT deverão ser tratados. Como dito anteriormente, a escolha da terapêutica farmacológica depende da fase da doença e ainda da subespécie envolvida. Os fármacos de primeira linha (Fig.4), tanto para a fase hemolinfática como para a meningoencefálica, são bastante efetivos, apesar de alguns apresentarem efeitos adversos bastante significativos principalmente os que atuam na fase meningoencefálica, já que transpõem a BHE.

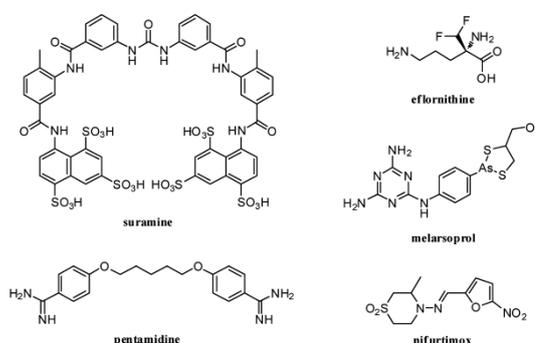


Figura 4 – Estrutura molecular dos fármacos atualmente usados na HAT ⁽¹⁶⁾

Para a fase hemolinfática do *T.b.rhodesiense* o fármaco de 1ª linha é a suramina, um derivado naftaleno simétrico polissulfonado, descoberto em 1921. Este fármaco apresenta elevado tempo de semi-vida (44 a 54 dias) devido à elevada ligação às proteínas plasmáticas ⁽²⁾ ⁽¹⁰⁾. Provoca alguns efeitos adversos tais como neuropatia periférica, nefrotoxicidade, erupção cutânea e reações de hipersensibilidade. A suramina é ativa na 1ª fase do *T.b.gambiense*, no entanto não é muito utilizada pelas consequências graves que causa nos

co-infectados com *Onchocerca volvulus* e pelo fato de existir um fármaco mais seguro para este caso ⁽⁴⁾.

A ação tripanocida da suramina ainda não está totalmente esclarecida, no entanto, existem diversas hipóteses quanto ao seu mecanismo de ação, nomeadamente de que o fármaco impede a captação de proteínas do soro e inibe a sua endocitose pelo parasita. A suramina liga-se a proteínas plasmáticas, incluindo às LDL, às quais o parasita fortemente se liga e endocita como resultado da ligação a recetores membranares específicos. As LDL são cruciais para o parasita, já que são uma fonte primária de esteróis para as formas sanguíneas.

Uma segunda hipótese diz respeito à acumulação do fármaco no interior dos lisossomas inibindo assim enzimas chave como a proteína cinase e a 3'-nucleotidase, que ligam à membrana plasmática do *T.brucei*, e a fosfatase ácida e pirofosfatase (ligadas a nível flagelar). Por outro lado a suramina inibe todas as enzimas glicolíticas carregadas positivamente que se encontram no interior do glicossoma do *T.brucei* ⁽²⁾. Apesar do parasita não ser capaz de sintetizar novamente colesterol e ácidos gordos e por isso o desenvolvimento de resistências à molécula ser improvável, alguns casos de falha no tratamento têm sido descritos, não se sabendo qual a origem destes mecanismos de resistência ⁽²⁾.

Na fase meningoencefálica por *T.b.rhodesiense* o fármaco de escolha é o melarsoprol, um composto organoarsénico descoberto em 1949 e introduzido para substituir o tryparsamide, também de origem arsénica ⁽⁴⁾ ⁽¹⁰⁾. É ativo nas duas subespécies de HAT, no entanto não é utilizado na forma gambiense pelo facto de ser mais caro e tóxico do que a alternativa existente ⁽²⁾. Para o segundo estadio de infeção por *T.b.rhodesiense* é o único tratamento existente, apresentando efeitos adversos bastante severos que podem pôr em causa a vida (taxa de mortalidade de cerca de 5,9%) ⁽¹⁴⁾. Uma das situações mais graves é a encefalopatia reativa, que surge em 5 a 10% dos doentes e que é fatal em aproximadamente 50% dos casos. A prednisolona é co-administrada, uma vez que o uso concomitante parece diminuir a ocorrência desta reação ⁽⁴⁾. O melarsoprol atua na fase neurológica uma vez que apresenta capacidade de transpor a barreira hematoencefálica, devido à lipossolubilidade que lhe é conferida pelo grupo arsenóxido reativo presente nos metabolitos ativos do fármaco. Uma parte significativa do fármaco é encontrada ligada às proteínas plasmáticas, apresentando o metabolito ativo um tempo médio de semi-vida no soro de 3,5 a 3,8 h e uma eliminação lenta a partir do LCR, com tempo de semi-vida de 120 h ⁽²⁾.

A entrada do melarsoprol nos tripanossomas é feita por transportadores de purinas, atuando o fármaco como um ligando competitivo para o sítio da purina na proteína transportadora. O transporte de purinas encontra-se muito desenvolvido nos tripanossomas, de modo a também rapidamente adquirirem os ácidos nucleicos dos hospedeiros. Assim, os tripanossomas lisam-se rapidamente quando expostos ao fármaco ⁽²⁾ ⁽¹⁵⁾.

A resistência a este fármaco tem vindo a aumentar principalmente na África Central, ⁽¹⁰⁾ havendo falhas no tratamento que rondam os 30% ⁽²⁾. A grande parte dos parasitas que apresentam resistência aos fármacos arsenicais demonstra ter perdido o transportador aminopurina P2. No entanto, nos tripanossomas em que o transportador é removido propositadamente, os parasitas são apenas ligeiramente menos sensíveis ao fármaco do que os *wild-type*. Isto sugere que outras vias secundárias de entrada do fármaco estarão envolvidas, e que no caso das resistências também essas vias alternativas estão alteradas para além do transportador de purinas ⁽²⁾ ⁽¹⁵⁾.

Quanto ao estadió hemolinfático por *T.b.gambiense* existe a opção da pentamidina, uma diamina aromática descoberta em 1941. Apesar de bem tolerada, podem surgir alguns efeitos adversos tais como hipoglicémia, náusea, vômito e diarreia ⁽¹⁰⁾. Os tripanossomas acumulam elevadas quantidades do fármaco através da permease aminopurina P2, sendo esta atividade dependente de energia ⁽¹⁴⁾. No entanto, existem ainda dois transportadores de pentamidina, um de elevada (HAPT1) e outro de baixa afinidade (LAPT1) também responsáveis pela absorção do fármaco. Tal explica o motivo pelo qual este fármaco resulta terapeuticamente aquando de resistências aos derivados arsenicais que perdem o transportador P2, antes referido. No entanto, no caso de perda dos transportadores específicos do fármaco também se desenvolverá resistência ⁽²⁾. A pentamidina apresenta um largo espectro atuando também na leishmaniose. No entanto, e apesar de transpor a barreira hematoencefálica, não o faz em concentração suficiente para ter ação nesta fase de infeção d *T.brucei* ⁽¹⁴⁾.

No respeitante à fase meningoencefálica do *T.b.gambiense* há a opção da eflornitina, um derivado do aminoácido ornitina, descoberta em 1990 ⁽¹⁰⁾. Este fármaco atua por inibição da enzima ornitina descarboxilase (ODC). A ODC é bloqueada no seu sítio ativo pela eflornitina que deste modo priva os tripanossomas da síntese de poliaminas, ocorrendo um aumento dos níveis de S-adenosimetionina. Este incremento vai levar à metilação de

proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes, sendo prejudicial para o parasita. Esta situação não se verifica no *T.b.rhodesiense*, uma vez que a enzima apresenta uma taxa de renovação rápida e por isso o bloqueio pela eflornitina não resultará no impedimento da sua ação ⁽²⁾. A entrada do fármaco nas formas sanguíneas de *T.brucei*, parece ser feita por difusão passiva mas também por transportadores saturáveis, responsáveis pela transposição a nível da barreira hematoencefálica. A resistência ao fármaco nas formas procíclicas parece estar associada à diminuição da entrada do mesmo, devendo-se tal situação à perda ou alteração nestes transportadores ⁽¹⁰⁾. O tempo de semi-vida da eflornitina, após administração via IV é de aproximadamente 3 h, apresentando este fármaco vários efeitos adversos severos como alterações gastrointestinais, convulsões e supressão da medula óssea.

O regime de administração convencional da eflornitina é bastante complexo e moroso e por isso é difícil o cumprimento adequado do tratamento, especialmente no continente africano onde as condições médicas são mais precárias. Por este motivo, uma nova terapêutica de combinação com o nifurtimox (NECT), instituída em Abril de 2009, surgiu após ser comprovada a eficácia e o perfil de segurança através de ensaios clínicos, uma vez que este fármaco primariamente foi aprovado para o tratamento da doença de Chagas (endémica no continente americano) causada pelo *Trypanossoma cruzi*. O nifurtimox atua por ativação de uma nitroreductase do tipo I, que conduz a um aumento de radicais livres a nível intracelular, causando lesões no parasita ⁽⁹⁾.

Tendo em conta que a administração de NECT é mais simples e requiere menos recursos humanos que a da eflornitina em monoterapia (NECT requiere 2 infusões diárias via IV durante 7 dias e a administração oral de nifurtimox 3 vezes/dia durante 10 dias, enquanto na monoterapia são requeridas 56 infusões IV de eflornitina - 4 infusões diárias durante 14 dias), ⁽⁴⁾ e dado que apresenta actividade mais promissora no *Trypanossoma brucei*, tornou-se parte integrante da lista de medicamentos da *World Health Organization* para o estágio meningoencefálico do *T.b.gambiense* ⁽²⁾ ⁽¹⁰⁾ apesar de ainda não estar aprovado pela *Food and Drug Administration* para a HAT, sendo utilizada *off-label* ⁽⁴⁾. Ainda, esta terapêutica de combinação permite diminuir o risco de desenvolvimento de resistências pelo facto dos dois medicamentos envolvidos terem mecanismos de ação distintos ⁽¹⁵⁾. Os diferentes procedimentos de administração dos fármacos, atualmente existentes para a HAT e anteriormente referidos, são apresentados de forma resumida na Tabela 2, quer para utilização em adultos quer em crianças. Os doentes deverão ser seguidos durante 2 anos

após o tratamento, devendo a cada 6 meses ser feita uma punção lombar e respetiva análise para detetar possíveis recidivas.

Tabela 2 – Modo de administração e posologias dos fármacos usados na HAT ⁽⁴⁾

Espécies	Fase	Fármaco	Dosagem Adulto	Dosagem Pediátrica
<i>T.b.rhodesiense</i>	Hemolinfática	<u>Suramina</u>	Dose ensaio de 100 mg IV a dar antes da 1ª dose e depois 1 g nos dias 1,3,5,14 e 21	Dose ensaio de 2mg/kg IV a dar antes da 1ª dose e depois 20 mg/kg IV nos dias 1, 3, 5, 14 e 21
<i>T.b.rhodesiense</i>	Meningoencefálica	<u>Melarsoprol</u>	2-3.6 mg/kg/dia IV x 3 dias. Após 7 dias, 3.6 mg/kg/dia x 3 dias. Dar uma 3ª série de 3.6 mg/kg/dia após 7 dias.	2-3.6 mg/kg/dia IV x 3 dias. Após 7 dias, 3.6 mg/kg/dia x 3 dias. Dar uma 3ª série de 3.6 mg/kg/dia após 7 dias.
<i>T.b.gambiense</i>	Hemolinfática	<u>Pentamidina</u>	4 mg/kg/dia IM ou IV x 7-10 dias	4 mg/kg/dia IM ou IV x 7-10 dias
<i>T.b.gambiense</i>	Meningoencefálica	<u>Eflornitina</u>	400 mg/kg/dia em 4 doses x 14 dias	400 mg/kg/dia em 4 doses x 14 dias

No que concerne à prevenção é importante tentar evitar a ida para países endémicos, sempre que possível, uma vez que não existe vacinação e é pouco provável que haja o seu desenvolvimento dado que o parasita apresenta glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) que são responsáveis pela variação antigénica que ocorre durante a infeção, permitindo assim escapar à resposta imune. Estas glicoproteínas de revestimento são codificadas em genes cassette que permitem a sua mudança regular, e como tal a expressão de novas VSG leva a que haja alteração na estrutura, impedindo o reconhecimento pelo sistema imune ⁽¹⁷⁾.

A quimioprofilaxia não é recomendada, uma vez que poderá levar ao desenvolvimento de resistências. No entanto, quando se viaja para os países em questão e no caso dos habitantes locais, deve evitar-se a ida para zonas florestais e para as margens dos rios, locais habituais da mosca Tsé-tsé. As medidas de prevenção devem envolver a proteção individual recorrendo a repelentes de insetos, roupas longas e impregnadas com permetrina, que cubram totalmente os membros, de grossura adequada (se demasiadamente finas o mosquito consegue picar) e de cores neutras pois as cores brilhantes, escuras e fortes chamam a atenção da mosca, usar telas e mosquiteiros e ainda inspecionar os veículos

dado que a mosca Tsé-tsé tende a permanecer no seu interior já que é atraída pelo movimento do automóvel ⁽³⁾.

3. Drug Discovery na Tripanossomíase Africana Humana

Uma vez que ainda não existe nenhum fármaco que seja efetivo simultaneamente em ambos os estadios da HAT, hemolinfático e meningoencefálico, ou para ambas as subespécies, dado que as resistências aos fármacos atualmente existentes têm vindo a aumentar e ainda tendo em conta que a atual terapêutica se processa por via parentérica e em regimes complexos, estando ainda sujeita a bastantes efeitos adversos, torna-se extremamente necessário o desenvolvimento de novos agentes anti-tripanosomais mais seguros e eficazes. A descoberta e o progresso de novos fármacos poderão ser facilitados pelo fato de em 2005 ter sido publicada a sequência do genoma do *T.brucei*, de existirem ferramentas genéticas cada vez mais robustas, que permitem detetar a relevância de um gene no parasita, e ainda pelo conhecimento crescente sobre a regulação dos genes. Com a utilização destes recursos foi possível determinar-se diversos alvos (Tabela 3) tais como enzimas envolvidas no metabolismo das purinas e pirimidinas, no metabolismo energético, na síntese de ácidos gordos, esfingolípido e poliaminas e ainda na modificação de proteínas e do DNA, nomeadamente as DNA Topoisomerases, que serão seguidamente abordadas ⁽⁹⁾.

Tabela 3 – Alvos terapêuticos para desenvolvimento de fármacos anti-HAT ⁽¹⁴⁾

Pathway	Enzymes	Validation	Status
Polyamine biosynthesis	ODC, AdoMetDC	Genetic and chemical	AdoMetDC – Lead optimization
Trypanothione biosynthesis	TryRed, TSHSyn	Genetic and chemical	Hit to Lead
Energy Metabolism/glycolytic enzymes	Hexokinase, Phosphoglucose isomerase, phosphofruktokinase, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; phosphoclycerate kinase; enolase	Genetic and chemical	PFK – Hit to Lead Aldolase – Hit identification
Purine and Pyrimidine metabolism	DHFR-TS, pteridine reductase, cytidine triphosphate synthetase	Genetic and chemical	DHFR-TS – Hit to Lead
DNA modification	DNA topoisomerases	Genetic and chemical	Topo – Hit identification
Fatty acid biosynthesis/utilization	Elongases, N-myristoyltransferase	Genetic and chemical	NMT – Hit to Lead
Sphingolipid biosynthesis	Sphingolipid synthase	Genetic	
Protein modification	Prenylation	Genetic and chemical	PFT – Lead optimization
Protein modification	Kinases	Genetic and chemical	GSK3 – Hit to Lead
Protein modification	Proteases (TbCatB)	Genetic and chemical	Hit identification and validation
tubulin	Tubulin assembly	Genetic and chemical	Hit identification

3.1. Maquinaria genética de *Trypanossoma brucei* - Cinetoplasto

O parasita *T.brucei* é um organismo com recursos biológicos invulgares, sendo um deles o facto de apresentar um cinetoplasto, designado kDNA, que constitui o genoma mitocondrial e que se localiza a nível da única mitocôndria da célula, apresentando uma topologia complexa. Caracteriza-se por ser uma rede condensada de estrutura planar, em

forma de disco, que envolve aproximadamente uma dúzia de maxicírculos (≈ 20 Kb) ligados com milhares de minicírculos (≈ 1 Kb) ⁽¹⁸⁾.

A síntese do kDNA envolve essencialmente os minicírculos, dada a sua elevada quantidade comparativamente com os maxicírculos e envolve primeiramente a sua libertação da rede, depois a sua replicação e por fim a religação dos

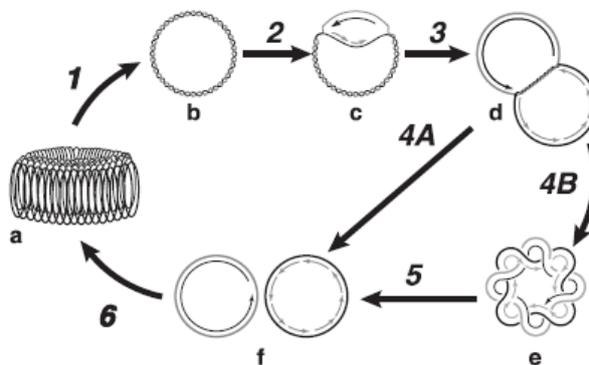


Figura 5 – Replicação dos minicírculos do kDNA ⁽¹⁸⁾

descendentes. Esta etapa requer um mecanismo de replicação não

convencional em que os minicírculos covalentemente fechados são libertados da rede numa região próxima do corpo basal flagelar (zona cinetoflagelar – rever Fig.1), dando-se a replicação propriamente dita fora da matriz da rede. A grande maioria dos minicírculos encontra-se no interior da rede (a), estando apenas uma minoria na forma livre de intermediários da replicação (b-f) (Fig.5).

A replicação inicia-se com a libertação/decatenação dos minicírculos monoméricos covalentemente fechados da rede (b), seguindo-se uma síntese de DNA unidirecional envolvendo intermediários de estrutura theta (c-d) a nível cinetoflagelar (estes intermediários são assim designados por se assemelharem à forma da letra grega com o mesmo nome: Φ). Posteriormente verifica-se a segregação dos círculos-filhos e a sua reconexão individual à rede (f). O DNA apresenta brechas que apenas são reparadas no momento em que todos os minicírculos se tenham replicado e a rede tenha atingido o dobro do tamanho, ficando apta a dividir-se em duas. São as enzimas localizadas no disco de kDNA, nomeadamente as DNA topoisomerases, que catalisam estes estados finais de replicação dos minicírculos, incluindo a remoção do *primer* e a resolução da maior parte das frinchas existentes entre os fragmentos, causadas pela libertação dos minicírculos ^{(18) (19)}.

3.2. Importância das DNA Topoisomerases no parasita

As DNA topoisomerases (TOPO) são enzimas ubíquas que catalisam mudanças topológicas nas moléculas de DNA, realizando esta modulação através da actividade de cisão, manipulação e reunião das cadeias de DNA, controlando também assim os níveis de

enrolamento do mesmo. São importantes no metabolismo dos ácidos nucleicos, nomeadamente na replicação, transcrição, condensação e recombinação cromossomal ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾.

Dado que o *T.brucei* apresenta na mitocôndria o genoma mitocondrial, a inibição destas enzimas importantes à manutenção do kDNA tornou-se um alvo crucial ao desenvolvimento de novos fármacos, já que sem a ação das TOPO se torna impossível a sobrevivência do parasita. Daí, o estudo e conhecimento destas enzimas bem como das suas funções a nível deste protozoário ter vindo a aumentar dadas as potencialidades para novas terapêuticas anti-HAT. Em seguida serão abordadas com maior pormenor as TOPO, nomeadamente as presentes no *T.brucei*, bem como as suas funções e particularidades.

As TOPO subdividem-se em dois tipos, tipo I (IA e IB) e II (II A e IIB), sendo que as do tipo I (TOPOI) induzem quebras transitórias nas cadeias simples, alterando-se o número de ligações em etapas de um, enquanto as tipo II (TOPOII) induzem quebras em ambas as cadeias de DNA, alterando-se o número de ligações em múltiplos de dois (Fig.6) ⁽²¹⁾. As topoisomerases alteram o estado topológico do DNA por clivagem das ligações fosfodiéster (as TOPO IA e II ligam-se covalentemente a nível 5'-terminal enquanto as IB se ligam a nível 3'- terminal durante a clivagem, havendo o desenrolar do DNA) e por formação da uma ligação covalente fosfotirosina, dando-se a transferência de segmentos de DNA através da quebra, sucedendo por fim a religação do DNA ⁽²²⁾.

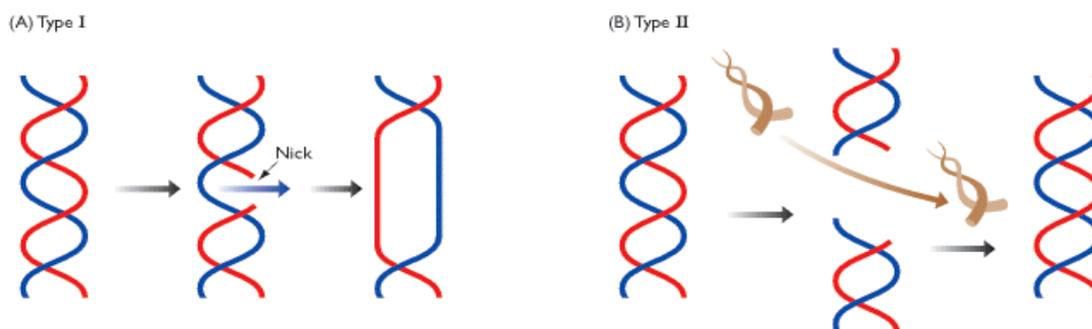


Figura 6 – Ação das DNA topoisomerases I e II ⁽²³⁾

3.2.1. DNA Topoisomerases I

3.2.1.1. DNA Topoisomerases IA

Nas TOPO I, as subfamílias IA e IB diferem na sequência, estrutura, especificidade do substrato, susceptibilidade à inibição e no mecanismo catalítico. As TOPO IA contêm um domínio Toprim (estruturalmente conservado) e requerem Mg^{2+} ⁽²⁴⁾. Fazem parte desta subfamília (IA) as topoisomerases IA e III, que se distinguem pela preferência por catalisar

reações de relaxamento e de conexão/libertação, respetivamente, devendo-se esta predileção à ausência ou presença de uma sequência de decatenação.

Apesar de requeridas, o papel das TOPO IA no metabolismo do DNA ainda não está completamente esclarecido, presumindo-se que as suas funções principais estão relacionadas com a recombinação e reparação do DNA. O seu envolvimento na replicação é demonstrado pelo nível anormal de divisão do DNA em células geneticamente deletadas da sua actividade, sendo que tal parece ser consequência da incompleta resolução dos intermediários presentes no momento da segregação cromossómica.

Assim, a resolução destes intermediários da replicação (pelas TOPO IA) processa-se essencialmente por dois mecanismos: remoção dos entrelaçados existentes entre as cadeias parentais (fig.5 - via 4A) ou permitindo que a replicação avance de modo a difundir o enrolamento na região replicativa (fig.5 - via 4B).

A pesquisa do genoma do *T.brucei* (pelo projeto de sequenciação “Tritryp”) ⁽¹⁸⁾ permitiu identificar a presença de três TOPO IA, localizando-se uma delas a nível do cromossoma 10 (IA) e duas a nível do cromossoma 2 (III), designadas respetivamente *T.brucei* TOPO IA mt, *T.brucei* TOPO III α e *T.brucei* TOPO III β . Constatou-se que a TOPO IA mt localizada a nível da mitocôndria, próximo do cinetoplasto, é diferente a nível filogenético uma vez que se assemelha mais com sequências de bactérias do que de eucariotas. Apresenta uma importante função a nível da resolução dos minicírculos de estrutura theta, dado que aquando do silenciamento da sua expressão via RNA interferência (RNAi) se verifica acumulação destes intermediários, perda da rede de kDNA e ainda paragem do crescimento celular ⁽¹⁸⁾.

Diversas experiências confirmaram o papel insubstituível da enzima, uma vez que nos tripanossomas desprovidos da sua ação as estruturas intermediárias theta acumularam, demonstrando assim que nem a via 4A nem a via 4B estariam disponíveis, impedindo assim a reconexão/catenação à rede (rever fig.5). Os resultados destas experiências parecem ser a primeira evidência em animais da contribuição das TOPO IA na replicação do DNA.

Confirmada a relevância desta enzima na replicação do kDNA, fundamental à sobrevivência do parasita, e dado que a *T.brucei* TOPO IA mt não apresenta ortóloga nos humanos, torna-se um excelente alvo para o desenvolvimento de novos antiprotozoários seletivos, dado que os efeitos prejudiciais no ser humano serão deste modo minimizados ⁽¹⁸⁾.

3.2.1.2. DNA Topoisomerases IB

As TOPO IB de eucariotas funcionam quer no núcleo quer na mitocôndria e apresentam quatro domínios (fig.7): o domínio nuclear de DNA, o maior, fundamental para a actividade da enzima e que apresenta um elevado grau de conservação filogenética, em especial em

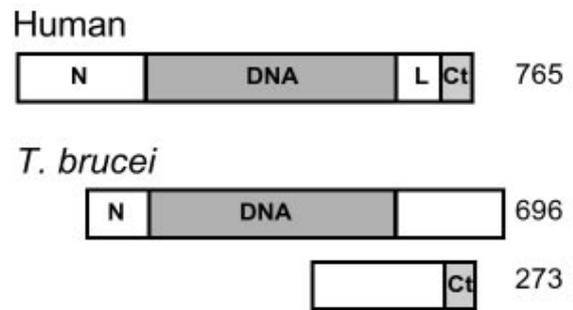


Figura 7 – Domínios das TOPO IB ⁽²⁴⁾

relação aos aminoácidos que interagem com o DNA; o domínio N-terminal hidrofílico não conservado; o domínio ligante, curto e pouco conservado, que liga o núcleo ao domínio catalítico; o domínio C-terminal catalítico, altamente conservado que contém o local ativo. As TOPO IB de *T.brucei* apresentam estes quatro domínios mas divididos por duas proteínas, codificadas por dois genes. Esta enzima heterodimérica é constituída pela subunidade larga (90 kDa), que abarca o domínio de ligação do DNA e pela subunidade pequena (36 kDa), que envolve a parte catalítica (Fig.7) ⁽²¹⁾ ⁽²⁴⁾.

Estas enzimas, ao contrário das IA, têm o seu papel bem caracterizado uma vez que são importantes para atenuar o superenrolamento ocorrido durante a síntese de DNA e RNA (dado que relaxam o enrolamento) e são independentes de Mg^{2+} . As camptotecinas, fármacos atualmente usados a nível oncológico, têm capacidade de inibir as TOPO IB e portanto também são potencialmente tripanocidas, como posteriormente se irá descrever ⁽²⁴⁾.

3.2.2. DNA Topoisomerases II

As TOPO II que se subdividem em duas formas, IIA e a IIB, distribuem-se diferentemente nos parasitas com cinetoplasto dado que na mitocôndria a enzima se encontra bem caracterizada, mas em relação ao núcleo é escassa a informação acerca da sua actividade.

A importância das TOPO II reside no facto destas enzimas intervirem na replicação do cinetoplasto, especificamente na segregação e condensação cromossómica, por via da actividade de catenação. Após a replicação, os cromátídeos descendentes permanecem ligados ao centrómero através da actividade de catenação das TOPO II, sendo fundamental a

presença da enzima para que haja uma correta coesão e adequada segregação. Experiências com RNAi comprovaram a estagnação da replicação aquando da inibição de TOPO II ⁽²⁵⁾.

Para além do referido anteriormente, a enzima apresenta atividade de decatenação (que envolve a clivagem da dupla cadeia de DNA) e atua no relaxamento da supertorção da dupla hélice de DNA, através da quebra e posterior religação das suas cadeias ⁽²⁵⁾.

A purificação das TOPO II demonstrou que os seus genes e proteínas eram de tamanho inferior comparativamente com o de outros eucariotas superiores e que estas enzimas não apresentam actividade tipo girase (enrolamento do DNA). Quanto à

constituição, as TOPO II envolvem um domínio C-terminal (não conservado), um N-A



replicação e a segregação de uma rede de DNA apresenta inúmeros desafios topológicos, requerendo provavelmente TOPO II nos vários passos. Uma das TOPO II mais cruciais é a mitocondrial (TOPO II mt), havendo outras TOPO II (*T.brucei* TOPO II α e *T.brucei* TOPO II β) que embora presentes parecem não ter um papel fundamental na replicação do kDNA dado que a sua inibição não causa nenhuma alteração significativa.⁽²¹⁾ Assim, e se a TOPO II mt fôr a única a nível mitocondrial, há que considerar a possibilidade da enzima apresentar mais funções a nível da segregação, que possam ainda ser desconhecidas.

3.2.2.1. DNA Topoisomerase II mt

A *T.brucei* TOPO II mt para além da actividade tradicional de reconexão dos minicírculos descendentes à rede e de outras possíveis funções como a libertação dos minicírculos pré-replicação, resolução dos minicírculos entrelaçados, remoção das torções introduzidas durante o desenrolamento das cadeias, apresenta também a capacidade de reparar as “brechas” existentes no cinetoplasto formadas aquando da libertação dos minicírculos da rede devido à quebra de várias ligações topológicas.

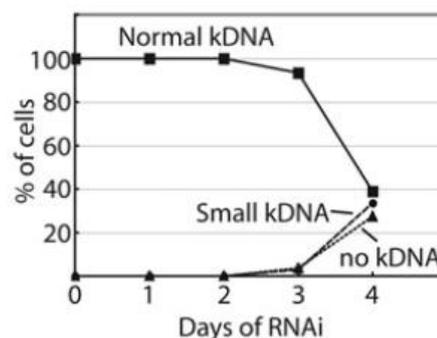


Figura 9 – Cinética da perda de kDNA durante TB TOPO II mt RNAi ⁽¹⁹⁾

Esta inesperada função, recentemente descoberta, torna a enzima num bom alvo para fármacos tripanocidas. De fato, verificou-se que nas redes *wild-type* os danos nas redes são eficientemente reparados, enquanto que quando há inibição da enzima por RNAi os buracos da rede kDNA tendem a persistir e expandir levando à diminuição do tamanho da rede (Fig.9) e à fragmentação da mesma, impedindo assim a replicação do genoma e consequentemente a sobrevivência do parasita.

Apesar da diminuição do tamanho do cinetoplasto poder ser explicada por diversos fatores, como o encurtamento devido à libertação contínua dos minicírculos sem religação dos descendentes ou a divisão assimétrica da rede, a explicação mais provável é que será devido à fragmentação causada pela ausência da reparação pela TOPO II mt. Na análise global pós-RNAi o tamanho do kDNA parece normal enquanto que na avaliação dos cinetoplasto a nível individual, nenhuma das redes isoladas apresentava tamanho adequado, o que leva a crer que sejam constituídas por fragmentos que permanecem junto ao corpo basal flagelar não se distribuindo pela mitocôndria ⁽¹⁹⁾. Deste modo, constata-se que a enzima remodela a rede durante a replicação de modo a manter uma densidade e estrutura /topologia adequada. ⁽¹⁹⁾

3.3. Inibidores das DNA Topoisomerases - Novos fármacos anti-tripanosomais

Dado que os fármacos atualmente existentes para a HAT apresentam diversos problemas, já anteriormente mencionados, e uma vez que o conhecimento acerca das TOPO é bastante alargado, constatando-se a sua relevância no

genoma de *T.brucei*, torna-se importante aproveitar esta informação para utilizar os inibidores destas enzimas como compostos líderes para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas. Dado que a maioria dos inibidores das DNA TOPO são atualmente utilizados na terapêutica oncológica, e tendo

Tabela 4 – Atividade dos inibidores das DNA Topoisomerases nas formas sanguíneas do *Trypanosoma brucei* ⁽²⁰⁾

Compounds	Target	<i>T. brucei</i>	
		ED ₅₀ (μM)	MIC (μM)
Anthracyclines			
Aclarubicin	topo I/II	0.0033	0.1
Doxorubicin	topo II	0.027	1
Camptothecins			
Camptothecin	topo I	0.43	100
7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin	topo I	0.12	100
10-Hydroxy-camptothecin	topo I	0.35	100
Irinotecan	topo I	21.5	>100
Topotecan	topo I	1.23	>100
Carbazoles			
Ellipticine	topo II	1.0	100
Rebeccamyacin ^c	topo I	0.27	>10
Miscellaneous			
Aurintricarboxylic acid	topo II	29.2	>100
Ellagic acid	topo I/II	27.4	100
Eriochrome Black T	topo II	30.1	100
Etoposide	topo II	1.36	>100
β-Lapachone	topo I	0.31	10
Mitoxantrone	topo II	0.0026	10

em conta que uma elevada percentagem desses fármacos demonstra atividade seletiva na

doença do sono, poderá poupar-se dinheiro e tempo na *Drug Discovery* ao serem testados os fármacos existentes ⁽²⁰⁾. Estes inibidores formam com as enzimas complexos covalentes com o DNA, causando lesões citotóxicas (Fig.13) ⁽²¹⁾.

Os estudos de atividade *in vitro* de diversos inibidores das TOPO para as formas sanguíneas de *T.brucei* (Tabela 4), demonstraram que todos os fármacos apresentavam ação anti-tripanososomal. Os mais promissores foram as antraciclina (aclerubicina e doxorubicina) e a antracenediona mitoxantrona uma vez que apresentaram maior seletividade e eficácia, ou seja, menor MIC e menor ED₅₀ associados a efeitos adversos suportáveis. Constatou-se que a actividade destes fármacos foi comparável à dos fármacos atualmente usados para a HAT: valores de ED₅₀ e MIC próximos dos da pentamidina (ED₅₀ 0,001 µM e MIC 0,0058 µM) e da suramina (ED₅₀ 0,13 µM e MIC 2,3 µM), excetuando o valor de MIC da mitoxantrona que é ligeiramente superior ⁽²⁰⁾.

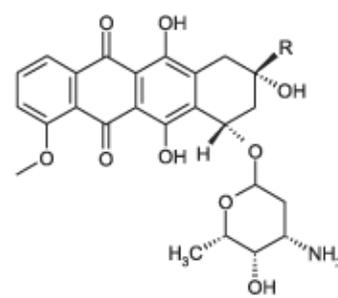
Quanto à seletividade, os ratios ED₅₀ e MIC entre células HL-60 (leucemia humana) e tripanossomas demonstraram que os fármacos testados apresentavam valores inferiores aos anti-HAT tradicionais: pentamidina, ED₅₀ ratio 1000 e MIC ratio 13 000; suramin, ED₅₀ ratio 500 e MIC ratio 200. Contudo, as antraciclina apresentaram os valores mais altos e por isso foram os mais seletivos dos fármacos testados (Tabela 5). As camptotecinas, inibidoras das TOPO IB, apresentaram valores bastante baixos o que leva a concluir que são mais tóxicas nas células humanas do que no parasita, ou seja, as concentrações necessárias para matar os tripanossomas são superiores às concentrações citotóxicas nas células humanas ⁽²⁰⁾.

Tabela 5 – Seletividade dos inibidores das DNA Topoisomerases ⁽²⁰⁾

Compound	ED ₅₀ (HL-60)/ED ₅₀ (<i>T. brucei</i>)	MIC _(HL-60) /MIC _(<i>T. brucei</i>)
Anthracyclines		
Aclarubicin	9.7	1000
Doxorubicin	1.3	>100
Camptothecins		
Camptothecin	0.08	>1
7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin	0.05	>1
10-Hydroxy-camptothecin	0.09	>1
Carbazoles		
Rebeccamycin	0.8	1
Miscellaneous		
β-Lapachone	1.3	10
Mitoxantrone	1.7	10

Assim, conclui-se que as antraciclina e a mitoxantrona são os fármacos mais promissores para a terapêutica de HAT, dado que para além da boa seletividade e eficácia apresentam também menor toxicidade que os fármacos convencionais anti-HAT.

As antraciclinas (ANT) são antibióticos usados essencialmente como agentes antineoplásicos numa ampla variedade de tumores e neoplasias hematológicas. A doxorubicina (DOX) foi isolada pela primeira vez em 1969 a partir da fermentação aeróbia da bactéria *Streptomyces peucetius caesius*. Atualmente também pode ser sintetizada quimicamente a partir de outra ANT, a daunorubicina, cuja actividade nas formas sanguíneas de TBR já foi demonstrado (Fig.10) ⁽²⁰⁾.



Daunorubicina R = CH₃CO

Doxorubicina R = HOCH₂CO

Figura 10 – Estrutura da Doxo e Daunorubicina ⁽²⁶⁾

Tradicionalmente a actividade da DOX baseia-se na inserção das suas moléculas entre as bases da cadeia de DNA, ligando-se ao nível da ligação açúcar-fosfato da cadeia. Deste modo bloqueia a síntese de DNA, assim como a síntese de RNA. Por outro lado, a intercalação da DOX na dupla hélice interfere com a actividade enzimática da topoisomerase II, promovendo quebras irreparáveis do DNA.

Apesar desta actividade tradicional como agente intercalante, estudos recentes demonstram que há também a formação de aductos de estrutura complexa por ligações covalentes com o DNA. Liga-se às proteínas plasmáticas em cerca de 50 – 85%, sendo maioritariamente excretada por via biliar e fecal. O tempo de $\frac{1}{2}$ vida plasmático é de 10 minutos, sendo a semivida terminal de 30 h ⁽²⁰⁾ ⁽²⁷⁾.

A aclarubicina, também pertencente às ANT, apresenta uma actividade 10 vezes superior (0,1 μ M) à da DOX (10 μ M), uma vez que para além de inibir a TOPO II também inibe a TOPO I e a quimiopripsina do proteossoma 20 S, também alvo de fármacos anti-HAT. Este fármaco (Fig.11), tal como as restantes antraciclinas, apresenta diversas hipóteses de mecanismo tais como ação alquilante, intercalante, *stress* oxidativo e efeitos diretos na membrana celular, ainda não estando totalmente esclarecido qual o principal ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾.

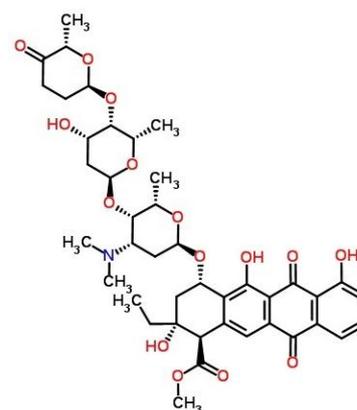


Figura 11 – Estrutura da Aclarubicina ⁽²⁸⁾

A mitoxantrona é uma antraciclina derivada da antracenediona (Fig.12), presentemente utilizada para tratamento de diversos cancros da mama, próstata e linfomas não-Hodgkin, que apresentou boa eficácia, apesar de no entanto a seletividade ser baixa (ratio MIC baixo). Atua por inibição da TOPO II, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente conhecido. Apresenta uma ligação às proteínas de cerca de 78 % (elevada distribuição), sendo excretada por via renal e hepato-biliar, exibindo uma semivida média de cerca de 12 dias (5-18 dias). Como principais efeitos adversos apresenta cardiopatias, mielosupressão, alterações hematológicas (leucopenia, neutropenia, trombocitopenia) e neurológicas (parestesia e convulsões), gastrointestinais e oculares ^{(20) (27)}.

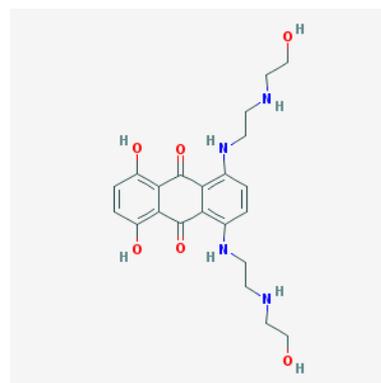


Figura 12 – Estrutura da Mitoxantrona ⁽²⁹⁾

De forma simplificada, a Fig. 13 mostra o potencial modo de atuação dos inibidores das DNA TOPO. Ocorre a formação dos complexos topoisomeras I e II com o DNA, seguido da intercalação com um inibidor que estabiliza o complexo DNA-Topoisomerase levando à sua fragmentação. Dado que os inibidores fazem a estabilização do complexo após o corte do DNA e antes deste ser recomposto, o DNA e a enzima ficam impedidos de continuar com as suas funções habituais ⁽³⁰⁾.

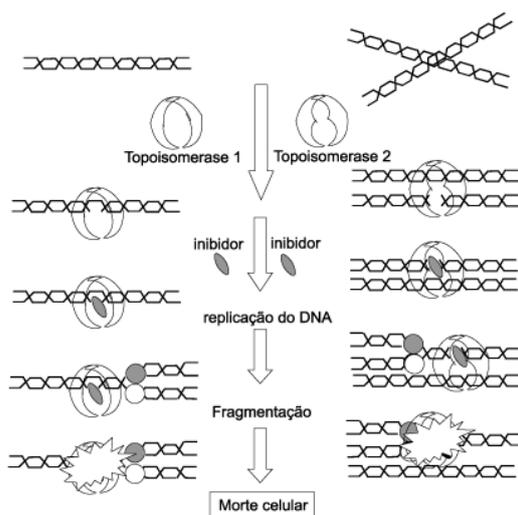


Figura 13 – Mecanismo de Inibição das TOPO ⁽³⁰⁾

4. Conclusão

Tendo em conta que a HAT é uma doença com consequências consideravelmente nefastas a nível da saúde e dado que o desenvolvimento de novos fármacos para esta patologia não é crucial a nível da indústria farmacêutica, já que a maior parte dos casos se verifica em locais onde as condições económicas e sociais não permitem o acesso aos medicamentos, torna-se fundamental aproveitar o conhecimento dos fármacos inibidores das DNA Topoisomerasas, atualmente utilizados noutras doenças, de modo a poupar tempo e dinheiro a na *Drug Discovery* anti-HAT.

Uma vez que há apenas um pró-fármaco (DB289) em fase 2 de ensaio clínico, uma diamidina, biodisponível por via oral, confirma-se a ausência de novos fármacos com ação tripanocida nos próximos anos o que deverá estimular o estudo mais aprofundado de inibidores das TOPO, nomeadamente das antraciclina, de modo a validar aqueles que apresentem maior potencialidade para a terapêutica anti-HAT.

Assim, torna-se fundamental a realização de experimentação *in vivo*, em ensaios clínicos adequados, destes inibidores de modo a garantir a eficácia e segurança adequada, bem como a correta posologia e via de administração, para possível implementação futura nas listas de medicamentos aprovados para a doença do Sono.

“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida”

Sigmund Freud

5. Bibliografia

1. FREI, F.; JUNCANSEN, C.; RIBEIRO-PAES, J.T.; - **Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: viés analítico decorrente do tratamento profilático.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro. Vol.24 n°2 (2008), p.2919-2925.
2. ETET, P.F.S.; MAHOMOODALLY, M.F.; - **New Insights in Staging and Chemotherapy of African Trypanosomiasis and Possible Contribution of Medicinal Plants.** The Scientific World Journal. (2012) Article ID 343652, 16 pages, doi:10.1100/2012/343652.
3. **Parasite in Humans.** [Acedido em 3 de Março às 20h30]. Disponível em <http://www.parasitesinhumans.org/trypanosoma-brucei-sleeping-sickness.html>
4. **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido em 3 de Março às 21h15]. Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/>
5. **Banco da Saúde.** [Acedido em 5 de Março às 13h15]. Disponível em <http://www.bancodasaude.com/press/o-que-saber-sobre-a-doenca-do-sono-provocada-por-a-mosca-tse-tse>
6. OOI, C.P.; BASTIN, P.; - **More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse.** Frontiers in cellular and infection microbiology. (2013) doi: 10.3389/fcimb.2013.00071.
7. **Journal of Cell Science.** [Acedido em 5 de Março às 22h10]. Disponível em <http://jcs.biologists.org/content/118/2/283.figures-only>
8. MACGREGOR, P.; MATTHEWS, K.R.; - **New discoveries in the transmission biology of Sleeping sickness parasites: applying the basics.** Journal of Molecular Medicine. Vol.88 (2010), p.865-871, doi 10.1007/s00109-010-0637-y.
9. PHILLIPS, M.; - **Stoking the drug target pipeline for human African Trypanosomiasis.** Journal of Molecular Microbiology. Vol.86 n°1 (2012), doi:10.1111/mmi.12001.

10. **World Health Organization.** [Acedido em 8 de Março às 10h30]. Disponível em http://www.who.int/trypanosomiasis_african/parasite/en/
11. SIMARRO, Pere et al. - **Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness.** PLoS Neglected Tropical Diseases. Vol. 6 nº10 (2012), doi:10.1371/journal.pntd.0001859.
12. **Microbe Wiki.** [Acedido em 8 de Março às 11h30]. Disponível em <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Trypanosoma>
13. **RichardWheeler.net.** [Acedido em 8 de Março às 11h30]. Disponível em http://www.richardwheeler.net/contentpages/image.php?gallery=Scientific_Illustration&img=Trypanosome_Life_Cycle&type=jpg
14. JACOBS,R.T.; NARE,B.; PHILLIPS,M.A.; - **State of the Art in African Trypanosome Drug Discovery.** Current Topics in Medicinal Chemistry. Vol.11 nº 10 (2011), p.1255-1274.
15. ALSFORD, Sam et al. - **High-throughput decoding of anti-trypanosomal drug efficacy and Resistance.** Nature. Vol.482 nº7384 (2012), p.232-236, doi:10.1038/nature10771.
16. HILTENSBERGER, Georg et al. - **Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Quinolone-Type Molecules against *Trypanosoma brucei*.** Journal of Medicinal Chemistry. Vol.55 (2012), p.2538-2548, dx.doi.org/10.1021/jm101439s.
17. DENNINGER, Viola et al. - **The FACT subunit TbSpt16 is involved in cell cycle specific control of VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*.** Journal of Molecular Microbiology. Vol.78 nº2 (2010), p.459-474, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07350.x.
18. SCOCCA,J.R.; SHAPIRO,T.A.; - **A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes.** Journal of Molecular Microbiology. Vol.67 nº4 (2008), p.820-829, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06087.x.
19. LINDSAY,M.E.; GLUENZ,E.; GULL,K.; ENGLUND,P.T.; - **A new function of *Trypanosoma brucei* mitochondrial topoisomerase II is to maintain kinetoplast DNA**

- network topology.** Journal of Molecular Microbiology. Vol.70 n°6 (2008), p.1465-1476, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06493.x.
20. DETERDING,A.; DUNGEY,F.A.; THOMPSON,K.A.; STEVERDING,D.; - **Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors.** Elsevier. (2005), p.311-316, doi:10.1016/j.actatropica.2005.01.005.
21. DAS,B.B.; SENGUPTA,T.; GANGULY,A.; MAJUMDER,H.K.- **Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating?.** Journal of Molecular Microbiology. (2006), doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05428.x.
22. TANG,S.C.; SHAPIRO,T.A.; - **Newly Identified Antibacterial Compounds Are Topoisomerase Poisons in African Trypanosomes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol.54 n°2 (2010), p.620-626, doi:10.1128/AAC.01025-09.
23. **Biosiva.** [Acedido em 22 de Março às 16h30]. Disponível em <http://biosiva.50webs.org/rep2.htm>
24. BODLEY, Annette L. et al. - **An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes.** PNAS.Vol.100 n°13 (2003), p.7539-7544.
25. OBADO, Samson O. Et al. - **Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*.** Nucleic Acids Research. Vol.39 n°3 (2010), p.1023-1033, doi:10.1093/nar/gkq839.
26. **Scielo.** [Acedido em 15 Abril às 22h30]. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100021
27. MACHADO,V.; CABRAL,A.; MONTEIRO,P.; GONÇALVES,L.; PROVIDÊNCIA,L.A.; - **O Carvedilol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclinas(Doxorrubicina) [88].** Revista Portuguesa de Cardiologia. Vol.27 n°10 (2008), p.1277-1296.
28. **Goldbio.** [Acedido em 18 Abril às 21h30]. Disponível em <https://www.goldbio.com/Aclarubicin-HCl-P6528-C249.php>

29. **Cancer Index.** [Acedido em 18 Abril às 22h30]. Disponível em <http://www.cancerindex.org/Mitoxantrone>

30. **Scielo.** [Acedido em 25 Abril às 15h30]. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000300019