



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



NATÁLIA CAMARGO BRAGA

**FISIOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL E
DESENVOLVIMENTO DE VACINAS HUMANAS: UMA
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

NATÁLIA CAMARGO BRAGA

**FISIOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL E
DESENVOLVIMENTO DE VACINAS HUMANAS: UMA
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção de grau de bacharel em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

RESUMO

As Leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde e as classificações mais atuais apontam três principais formas clínicas: a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Visceral (LV). A alta prevalência da LV no Brasil, e sua alta letalidade, torna necessário o aumento das pesquisas sobre a fisiopatologia da doença, assim como tratamentos mais efetivos, e formas de prevenção seguras como a vacina. Este estudo teve como objetivo realizar uma pesquisa bibliográfica descritiva e qualitativa sobre aspectos do ciclo de vida de *Leishmania*, suas formas clínicas, diagnóstico e tratamento, com ênfase nos principais fatores de virulência do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro na fisiopatologia da LV, bem como o cenário atual no desenvolvimento de vacinas de uso humano. Exploramos como as respostas imunológicas humanas, a imunopatologia e as interações do hospedeiro com *Leishmania* afetam a eficácia de vacinas, diagnósticos e medicamentos. Devido à complexidade dessas interações e mesmo com diversos estudos em andamento, poucas vacinas de uso veterinário já entraram e saíram do mercado, e para humanos ainda estão em desenvolvimento. Ainda é necessário aprofundar nossa compreensão e melhorar a eficiência das ferramentas de tratamento, controle e eliminação dessa doença.

Palavras-chave: fisiopatologia; parasitologia; Leishmaniose; vacinas; prevenção e controle.

ABSTRACT

Leishmaniasis are considered neglected tropical diseases by the World Health Organization and the most current classifications point to three main clinical forms: Cutaneous Leishmaniasis (CL), Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) and Visceral Leishmaniasis (VL). The high prevalence of VL in Brazil and its high lethality make it necessary to increase research into the pathophysiology of the disease, as well as more effective treatments and safe forms of prevention such as vaccines. This study aimed to carry out a descriptive and qualitative bibliographical survey on aspects of the Leishmania life cycle, its clinical forms, diagnosis and treatment, with an emphasis on the main virulence factors of the parasite and the host's immune response in the pathophysiology of VL, as well as the current scenario in the development of vaccines for human use. We explore how human immune responses, immunopathology and host interactions with Leishmania affect the efficacy of vaccines, diagnostics and drugs. Due to the complexity of these interactions and even with several ongoing studies, few vaccines for veterinary use have entered and left the market, and those for humans are still under development. There is still a need to deepen our understanding and improve the efficiency of tools for treating, controlling and eliminating this disease.

Keywords: pathophysiology; parasitology; leishmaniasis; vaccines; prevention and control.

SUMÁRIO

FISIOPATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL E DESENVOLVIMENTO DE VACINAS HUMANAS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. METODOLOGIA	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)	7
3.2 Leishmanioses	8
3.2.1 Inseto vetor	10
3.2.2 Reservatórios.....	11
3.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	12
3.4 Leishmaniose Visceral	13
3.5 Fisiopatologia da Leishmaniose Visceral	14
3.5.1 Fatores de virulência da <i>Leishmania</i>	15
3.5.2 Reações do sistema imunológico humano ao parasitismo	17
3.6 Desenvolvimento de vacinas	20
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	23
5. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são consideradas como doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde e pode ser subdividida em três principais formas clínicas: a Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Visceral (LV). Tais formas podem ser encontradas por todo o mundo, sendo que cerca de 100 países são considerados endêmicos para essa parasitose. A LC em geral, pode ser caracterizada pela presença de lesão ulcerada com bordas elevadas, geralmente nos membros inferiores, o que torna mais fácil o diagnóstico da doença, quando a lesão está presente. A LMC é uma forma grave de infecção, afetando pele e mucosas, incluindo o nariz, boca e garganta, levando a lesões destrutivas e desfigurantes, caracterizadas por inflamação das mucosas, dificuldade na respiração e na alimentação. A LV pode ser assintomática, mas pode haver o aparecimento de sintomas clássicos e inespecíficos como febre, anemia, hemorragia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia, diarreia, que são característicos de outras doenças, necessitando de um diagnóstico diferencial rápido e eficaz devido às complicações que podem surgir. A LV se não tratada, pode levar a pessoa a óbito em 90% dos casos.

A Leishmaniose Visceral é endêmica em cinco continentes, sendo que mais de 90% dos casos mundiais ocorrem em países como Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Devido à alta letalidade da LV e sua alta prevalência no Brasil (97% dos casos da América do Sul), pesquisas que visem um melhor entendimento sobre a fisiopatologia da doença, tratamentos mais efetivos, e uma alternativa mais eficaz e segura para sua prevenção, como as vacinas, são primordiais. Portanto, este trabalho teve como objetivo revisar as mais recentes publicações sobre a fisiopatologia da LV e o panorama do desenvolvimento de vacinas humanas para LV.

2. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada por meio de levantamento bibliográfico, de caráter descritivo e qualitativo, a partir de pesquisa de artigos e outros textos em bases de dados como o Google Acadêmico, Scielo, PubMed, e Boletins no site do Ministério da Saúde dos últimos dez anos (2013 a 2023), com ênfase em artigos de revisão e periódicos de referência na área do tema. Os principais termos utilizados nas pesquisas foram “Leishmaniose Visceral”, “Leishmanioses”, “fisiopatologia”, “vacinas” e, em inglês, “Visceral Leishmaniasis”, “immunopathology” e “vaccines”, adicionando ainda referências sobre o ciclo de vida do parasito, seus vetores, diagnóstico e tratamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são endêmicas em populações de baixa renda, afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, onde há pouca disponibilidade de serviços de saúde, rede de esgoto inexistente ou ineficaz, água potável de difícil acesso, deficiência no saneamento básico, habitação, educação e informação em saúde. Essas doenças são causadas por parasitos ou outros agentes infecciosos, e possuem indicadores e investimentos em pesquisa extremamente baixos, dificultando o desenvolvimento de medicamentos e/ou vacinas, tornando-se difícil de controlá-las. DTNs como a Malária, Doença de Chagas, Leishmaniose Visceral, dentre outras, são parasitoses com altos índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo, representando uma necessidade mundial de maior atenção a essas populações (FIOCRUZ, 2023).

São classificadas como DTNs, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017), as seguintes doenças: Úlcera de Buruli (Bairnsdale, de Searls ou de Daintree); Doença de Chagas; Dengue e outras arboviroses; Dracunculíase; Equinococose cística e alveolar; Treponematoses endêmicas (Bouba); Trematodíases de origem alimentar; Tripanossomíase Humana Africana; Leishmanioses; Hanseníase; Filaríase linfática; Micetoma; Oncocercose; Raiva; Esquistossomose; Helmintíases transmitidas pelo solo; Teníase de *Taenia solium* e neurocisticercose; Tracoma.

A Organização Mundial de Saúde também criou metas de desenvolvimento sustentável para serem alcançadas até 2030 (*Sustainable Development Goals – SDGs*), que visam “garantir vida saudável e assegurar o bem-estar de todos, em todas as idades”, reduzindo a pobreza e subnutrição, melhorando o saneamento básico e acesso a água potável, igualdade de gênero e educação. Dessa forma, haverá um controle na disseminação dessas doenças, e melhora na vida das pessoas acometidas. Para isso, será necessário revitalizar parcerias globais, incentivar os programas e iniciativas nacionais, reunindo governos de países endêmicos, agências internacionais, empresas farmacêuticas, ONGs internacionais, universidades e sociedade civil (Organização Mundial da Saúde, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2017), apesar das Metas, há desafios a serem vencidos após implementação das medidas de controle dessas doenças, sendo indispensável continuar avaliando e monitorando, garantindo vigilância de pós-controle, e para isso será necessário um financiamento adicional, o que a maioria

dos programas nacionais de DTNs não possuem. Além disso, é preciso esforços contínuos para garantir que os tratamentos sejam implementados de forma eficaz, com formas de monitorar e manter a vigilância, buscando medicamentos alternativos (se houver perda de eficácia) durante o tratamento, ou no caso de desenvolvimento de resistência. Nesse cenário, um sistema de notificação eficaz para manter a cobertura das DTNs também precisa ser desenvolvido, e para isso, a educação em saúde deve ser adaptada aos diversos contextos locais, enfatizando regiões com maior foco de transmissão (Organização Mundial da Saúde, 2017). Muito ainda precisa ser realizado para tentar controlar essas doenças, e a colaboração mundial é de extrema importância.

3.2 Leishmanioses

As Leishmanioses são DTNs que estão distribuídas em todo o mundo, principalmente na América Latina, África, Ásia e Sul da Europa, e maior prevalência no Sudeste Asiático, África Oriental e Brasil. Acredita-se que o primeiro caso da doença foi em 1571 pelo relato de Pedro Pizarro, onde povos eram dizimados por um “mal de nariz” no Peru (Fiocruz, 1997). Atualmente, há cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos em todo o mundo (Figura 1), com estimativas de 1 bilhão de pessoas em risco de infecção (KHALAIFAH, 2022).

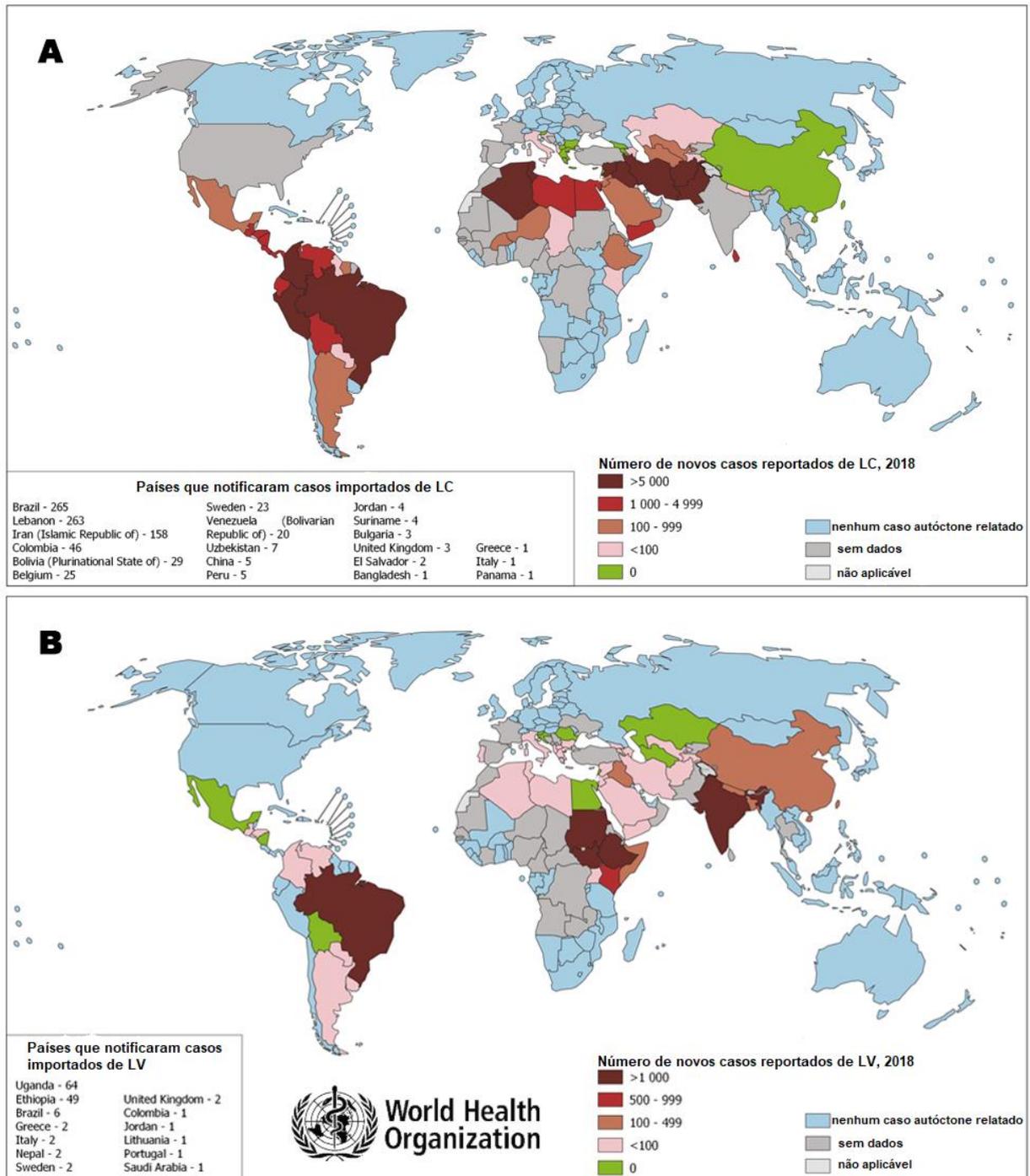


Figura 1: Notificação de casos de Leishmaniose Cutânea (A) e visceral (B) em 2018
 Fonte: adaptado da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020).

As Leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae; com formas clínicas que se apresentam desde lesões cutâneas autocuráveis até doenças sistêmicas que podem ser fatais se não tratadas. Essa doença pode ser encontrada nas principais formas de manifestação: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, sendo que todas essas formas da doença são causadas por espécies diferentes de *Leishmania*

com formas clínicas distintas, associadas a cada uma das espécies causadoras (OPAS, 2023).

De acordo com Khalaifah (2022), a forma mais encontrada mundialmente é a LC, que causa lesões cutâneas não letais e, na maioria dos casos, após a cura, leva ao desenvolvimento de imunidade contra reinfecção. As espécies mais comuns que causam LC são *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* (SCOTT; NOVAIS, 2016). Porém, em indivíduos imunocomprometidos ou com sistema imune enfraquecido, podem evoluir para quadros de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). A LCD é uma forma rara da doença, em que as lesões cobrem maior parte da superfície da pele, e há parasitas nas lesões, assim como, nódulos com infiltração cutânea difusa sem ulceração (KHALAIFAH, 2022). No caso da LMC, esse quadro clínico se manifesta com a ocorrência de linfagite, obstrução nasal, perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal (GOMES, et al. 2004).

Por fim, a Leishmaniose Visceral, forma clínica mais grave, sendo possivelmente fatal se não tratada, é causada por *L. donovani* (África, Índia, Ásia), *L. infantum* (Bacia do Mediterrâneo) ou *L. chagasi* (América), sendo caracterizada por febre prolongada, hipergamaglobulinemia, esplenomegalia e pancitopenia (COSTA DA SILVA, et. al, 2022). Após cerca de 6 meses, 20% dos pacientes tratados podem desenvolver uma erupção cutânea hipopigmentada na face ou nas partes superiores do corpo, condição chamada de Leishmaniose Dérmica pós-Calazar (KHALAIFAH, 2022).

3.2.1 Inseto vetor

O inseto vetor da Leishmania, são as fêmeas de flebotomíneos, conhecidos popularmente no Brasil como “mosquito-palha”, “tatuquira”, “cangalhinha” e “birigui”. Tais vetores são da ordem Diptera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, como as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (NASCIMENTO, 2013). São insetos pequenos com cerca de 2 a 4 mm e possuem coloração amarelada, e geralmente se reproduzem em locais úmidos, sombreados e com matéria orgânica em decomposição, como por exemplo, buracos no solo, chiqueiros, tocas de animais, tronco de árvores, e não se distanciam muito dos criadouros, por não terem capacidade de voo tão eficiente, se dispersando apenas cerca de 400 metros (FIOCRUZ, 2019).



Figura 2: Fêmea de Flebotomíneo – imagem ampliada

Disponível em: <https://leishmaniosevisceralcanina.com.br/mosquito-palha-leishmaniose-canina/>

De acordo com a Rocha (2019), esses insetos possuem hábitos noturnos, se abrigando durante o dia e iniciando suas atividades ao entardecer; as fêmeas precisam do repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos ovos, e buscam em animais e seres humanos; enquanto os machos se alimentam preferencialmente de seiva de plantas. Após o repasto sanguíneo das fêmeas, ocorre a maturação dos ovos que são deixados nos locais de criadouros preferidos por esses insetos, para então se desenvolverem.

Os flebotomíneos são insetos do tipo holometábolos, ou seja, seu ciclo de vida possui quatro estágios principais: ovo, larva, pupa e adultos. Sua larva também passa por quatro fases de desenvolvimento (estádios), sendo que o primeiro instar a larva possui um par de cerdas caudais; do segundo ao quarto instar são dois pares de cerdas caudais. O desenvolvimento da larva dura cerca de 18 dias, dependendo das condições do local, que se desfavoráveis podem prolongar esse tempo. Nesse período as larvas se alimentam de matéria orgânica em decomposição, e por possuírem muita mobilidade se deslocam em busca do alimento podendo se distanciar desses criadouros, dificultando a localização exata dessas larvas. Quando a larva se desenvolve para pupa, ela deixa de se alimentar e entra em fase de repouso de 7 a 12 dias, até emergirem na fase adulta (NASCIMENTO, 2013).

3.2.2 Reservatórios

De acordo com a Sociedade Brasileira de Parasitologia (2021), reservatório é qualquer local, vegetal, animal ou humano em que um agente etiológico consegue se multiplicar, e infectar outros hospedeiros, sendo que o reservatório ideal é aquele que contém o agente etiológico, mas não padece. O gênero *Leishmania* contém diversos

hospedeiros zoonóticos, com maiores evidências aos mamíferos. Foi constatada infecção por *Leishmania spp*, nas Américas, dentro das ordens de mamíferos silvestres Didelphimorphia, Cingulata, Pilosa, Rodentia, Primata, Carnívora e Chiroptera; sendo que a ordem Carnívora geralmente é a responsável pela maior transmissão de *Leishmania* no ambiente urbano (OPAS, 2021). Essa ordem inclui os cães domésticos, reservatórios urbanos importantes de *Leishmania*.

3.3 Ciclo de vida de *Leishmania sp*.

De acordo com Ministério da Saúde (2014), os insetos vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são os principais responsáveis pela transmissão da Leishmaniose no Brasil, que ao realizarem o repasto sanguíneo, se infectam por sugarem o sangue de mamíferos já infectados com os parasitas. Durante esse repasto sanguíneo do inseto (com o sangue contaminado), há a ingestão de formas amastigotas de *Leishmania*, que após um período no trato digestivo do inseto se diferenciam em promastigotas flagelados, que vão se reproduzir por divisão binária, e se transformam em paramastigotas. Estes se diferenciam em promastigotas metacíclicos, a forma infectante, que ficam alojados no esôfago e faringe do vetor. Esse processo demora em torno de 72 horas, e após completo, quando esse inseto infectado realiza um segundo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, como o homem, injetam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com sua saliva no local da picada (BRASIL, 2014).

No corpo do hospedeiro vertebrado, esses promastigotas podem migrar pela corrente sanguínea para órgãos do sistema retículo endotelial, como fígado, baço, medula óssea e linfonodos, sendo fagocitados por células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos), e dentro dessas células, o parasita se diferencia em amastigotas. Parte destes amastigotas podem ser ingeridos novamente por um inseto durante um novo repasto sanguíneo (BRASIL, 2014), conforme ilustrado na Figura 3, disseminando o parasita.

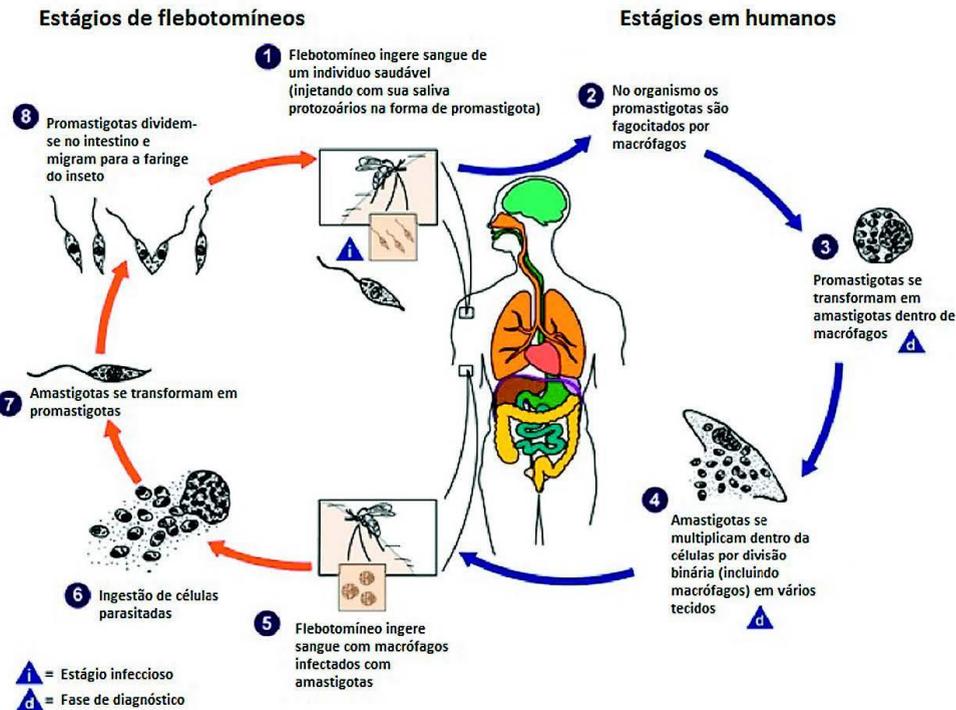


Figura 3: Ciclo de vida da *Leishmania sp.*

Fonte: Adaptado de CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2023)

3.4 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral é uma infecção causada por parasitas do gênero *Leishmania*, é uma doença tropical negligenciada de extrema importância, considerada endêmica no Brasil. Pode ser classificada como uma zoonose, porém, quando o homem entra em contato com o parasita em seu ciclo de transmissão, torna-se uma antropozoonose (BRASIL, 2006). As espécies de parasitas que são responsáveis pela LV no mundo, são de três principais gêneros, a *Leishmania chagasi*, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, sendo que a *L. chagasi* é a responsável pela LV na América Central e América do Sul e é transmitida pelo inseto da espécie *L. longipalpis* (BRITO et al., 2020).

No Brasil, a LV se expandiu do meio rural para as áreas urbanas, o que aumentou o número de casos, e principalmente em crianças por possuírem o sistema imunológico imaturo e com quadros de desnutrição; já em adultos, geralmente são assintomáticos ou oligossintomáticos (BRASIL, 2014). Essa doença tem grande ligação com a susceptibilidade do hospedeiro, de forma que também foram encontrados casos em imunossuprimidos pelo uso de fármacos imunossupressores, em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, e na coinfeção com HIV (LINDOSO et al., 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde (2014), a LV é uma doença de notificação compulsória, que pode apresentar manifestações discretas, moderadas e graves, como: febre, perda de peso, palidez e hepatoesplenomegalia. Também são regularmente observados anemia, neutropenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, proteína C reativa elevada (PCR) e alta taxa de hemossedimentação (VHS), sendo que cerca de 5 a 10% dos pacientes morrem desta doença, resultante de complicações letais de coinfeções bacterianas e hemorragias, e por essa condição, deve-se obter um diagnóstico e tratamento de forma rápida e precisa (BRASIL, 2014).

3.5 Fisiopatologia da Leishmaniose Visceral

Considerando o quadro de LV, no organismo humano, os macrófagos infectados são rompidos após a multiplicação exacerbada dos amastigotas da *Leishmania* em seu citoplasma, liberando-os na corrente sanguínea do hospedeiro, onde serão novamente fagocitados por outros macrófagos, e o ciclo de multiplicação avança, disseminando-os para outros tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. A patogênese da Leishmaniose é muito variável dependendo da espécie infectante e seus fatores de virulência, assim como o hospedeiro, que também determina o curso da doença (DUARTE, 2009).

Em relação a fagocitose do parasita pelo macrófago, há questões que precisam ser discutidas para compreensão da fisiopatologia da doença, como a permanência e multiplicação na célula hospedeira, sem ser destruído por ela. De acordo com Elmahallawy e Alkhalidi (2021) a *Leishmania* persiste nas células hospedeiras, pela capacidade de modular o sistema imunológico do hospedeiro utilizando de vários mecanismos, como por exemplo, induzindo a imunossupressão ou modificando os perfis de quimiocinas do hospedeiro, citadas no item 3.5.2.

Há muitos fatores de virulência que contribuem para essa infectividade de *Leishmania* e seu parasitismo intracelular, além da inibição da resposta imunológica do hospedeiro. Tanto as proteinases do parasita quanto do hospedeiro afetam a dinâmica da infecção, sendo que as classes de proteinases nas espécies de *Leishmania* incluem cisteíno-proteases, metaloproteases e serino-proteases; por sua vez, as proteinases do hospedeiro, como as metaloproteinases da matriz, podem subverter a resposta imune do hospedeiro. Existem outros fatores de virulência (Figura 4) que podem modular a interação da *Leishmania* com as células imunes do hospedeiro, como os glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), lipofosfoglicano (LPG), proteofosfoglicano (PPG), proteína A2, proteinases, proteinase ácida de superfície (Gp63) e proteína de membrana cinetoplastidial de 11 kDa (KMP-11) (ELMAHALLAWY & ALKHALIDI, 2021). Os principais

fatores de virulência da *Leishmania* envolvidos nesse processo de patogênese são discutidos a seguir.

3.5.1 Fatores de virulência da *Leishmania*

Lipofosfoglicanos (LPG): São macromoléculas presentes na superfície dos promastigotas de *Leishmania*, e ausente ou regulado negativamente nos amastigotas. Possui quatro porções: uma âncora de inositol (glicosilfosfatidilinositol, GPI), um núcleo glicano, uma cadeia linear de fosfoglicano (PG) e uma capa oligossacarídica terminal. Os lipofosfoglicanos possuem heterogeneidade, com modificações em sua estrutura durante todo o ciclo de vida do parasita, e com alterações entre as espécies, sendo uma das características principais desse fator de virulência. Essas variações inter e intraespécies estão envolvidas na sobrevivência do parasita dentro dos insetos flebotomíneos, gerando uma seletividade, permissividade e competência de determinado vetor de flebotomíneo para cepa específica da *Leishmania* (FORESTIER & BOONS, 2015).

Ainda de acordo com Forestier & Boons (2015), o lipofosfoglicano é a primeira interação do parasita com hospedeiro após ser inoculado pelo vetor, sendo o primeiro alvo para detecção imunológica, mas também serve como uma barreira de proteção do parasita contra o sistema imunológico do hospedeiro. O LPG evita que o parasita seja lisado pelo sistema complemento do hospedeiro, realizando um impedimento estérico na ligação das moléculas do complemento ou até inativando-as na superfície do promastigota. Além do mecanismo de escape da resposta imune, favorece a sobrevivência intracelular do parasita ao intervir em respostas pró-inflamatórias das células hospedeiras, ligando-se ao receptor Toll-like (TLR) 2 e 4 em macrófagos e em células NK.

Glicoproteína 63 (gp63): É uma metaloprotease dependente de zinco que fica na superfície do parasita e que facilita a inativação do sistema complemento no soro do hospedeiro, a interação com o macrófago e sobrevivência intrafagolisossomal (MCGWIRE, et. al. 2003). A gp63 modula a resposta imune de citocinas, visto que a regulação negativa da expressão da gp63 nos parasitas torna-os mais suscetíveis à lise pelo sistema complemento do hospedeiro e leva a resposta do tipo TH1 no local da inoculação. Essa metaloproteína ainda interfere nas cascatas de sinalização e fatores de transcrição, impedindo que haja uma resposta das células hospedeiras durante a infecção (SILVA-ALMEIDA, et. al, 2012).

Fosfolipídios de Glicoinositol (GIPLs): Nas células de *Leishmania* tanto a glicoproteína de superfície gp63 quanto os LPGs se ligam a uma bicamada lipídica de

glicolípídeos contendo inositol (GIPLs). Esses GIPLs são produzidos em todos os estágios de desenvolvimento do parasita e em algumas espécies há evidências de que essas moléculas desempenham importante função dentro dos macrófagos, inibindo a ativação e/ou síntese de elementos de proteção do macrófago, como a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e proteína quinase C, mantendo o parasita vivo, ou seja, as GIPLs possuem função essencial na sobrevivência do parasita na célula hospedeira (ELMAHALLAWY & ALKHALDI, 2021).

Fosfatases ácidas: São um grupo de enzimas liberadas principalmente na fase promastigota da *Leishmania*. Em grandes quantidades provocam resposta imunitária humoral no hospedeiro, adaptam o parasita em ambientes ácidos e adquirem nutrientes das células hospedeiras. A fosfatase ácida que está ligada à membrana tem capacidade de reduzir a “explosão respiratória” (*burst oxidativo*) de neutrófilos, e inibe a produção de metabólitos oxidativos tóxicos dos neutrófilos, sendo mais um mecanismo de sobrevivência dos parasitas nas células hospedeiras. Também temos a fosfatase ácida secretora (SAP), considerada um importante fator de virulência em espécies de *Leishmania*. Essa proteína é secretada do retículo endoplasmático e depois é transferida para a superfície ou é secretada por meio do reservatório flagelar (KHALAIFAH, 2022).

Nucleotidasas: São proteínas ancoradas na membrana, voltadas para o meio extracelular e estão relacionadas com a alta capacidade do parasita de infectar macrófagos humanos. Essas ectonucleotidasas auxiliam na hidrólise de nucleotídeos extracelulares modulando a infectividade, uma vez que geram nucleosídeos capazes de atravessar a membrana plasmática por transportadores especializados (receptores de purina), evitando a morte da *Leishmania* através de “armadilhas” extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps – NETs*). Essa alteração na concentração de nucleotídeos extracelulares é detectada pelo sistema imunológico, estimulando uma proliferação de linfócitos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico, citocinas e quimiocinas no local (PERES, et al., 2018)

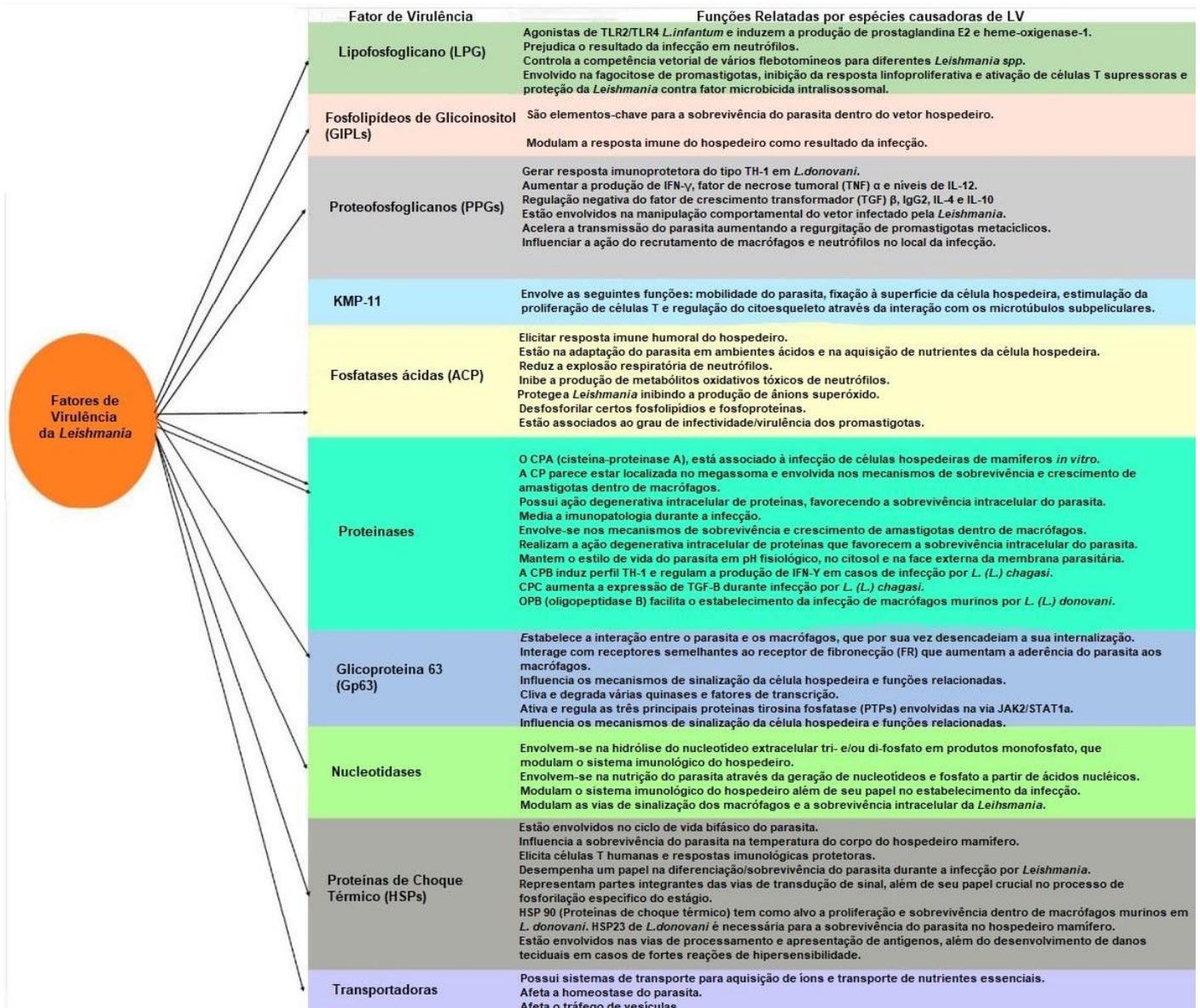


Figura 4: Os fatores de virulência da Leishmaniose visceral (LV) e suas funções relacionadas
 Fonte: Adaptado de Elmahallawy & Alkhaldi (2021).

3.5.2 Reações do sistema imunológico humano ao parasitismo

Após a inoculação dos promastigotas infectantes de *Leishmania donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi*, estes são fagocitados pelos macrófagos, e seus antígenos são apresentados às células T, desenvolvendo a imunidade adaptativa. Inicialmente, há a ativação dos fatores de virulência do parasita, como o lipofosfoglicano, glicoproteína 63, e outras, enquanto no hospedeiro há a ativação de receptores Toll-like (TLRs) e outros receptores, além do aumento da síntese de hidrolases, peptídeos antimicrobianos dos macrófagos infectados, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico produzidos pelos mesmos e por outras células mononucleares do sistema imunológico. A doença se desenvolve quando há a subversão da resposta imunológica do hospedeiro, pela ação

dos fatores de virulência dos parasitas (Figura 4), fornecendo assim condições para a sobrevivência intracelular da *Leishmania* (COSTA, et al., 2023).

De acordo com Zacarias et. al (2017) o desenvolvimento da LV é mais suscetível em indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles que vivem com HIV ou tomam medicamentos imunossupressores, mas também tem prevalência em pessoas mais jovens; pessoas de idade avançada; pessoas em estado de desnutrição, visto que possuem um sistema imunológico enfraquecido.

Com a infecção estabelecida, ocorre a multiplicação e a disseminação dos amastigotas nos fagócitos mononucleares, aumentando os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, e citocinas reguladoras, como IL-10, dependendo do perfil de ativação dos macrófagos. A não suscetibilidade à infecção ocorre quando os macrófagos que fagocitaram o parasita, produzem IL-12 que estimula a produção de clones de células TH1 pró-inflamatórias para liberar IFN- γ (interferons), que estimulam outros macrófagos a produzirem NO e espécies reativas de oxigênio, induzindo os mecanismos de morte dos parasitas (COSTA, et al., 2023). De acordo com a literatura, a imunidade adaptativa depende do perfil de ativação de macrófagos e linfócitos auxiliares, sendo mediada pela união de respostas M1/TH1 e respostas M2/TH2. Ou seja, os macrófagos do tipo M1 expressam iNOS (óxido nítrico sintase induzida), e direcionam as células T a gerar citocinas de perfil TH1, que induzem resposta protetora no hospedeiro; enquanto a infecção de macrófagos por *Leishmania* aumenta o estímulo da resposta TH2 (os macrófagos M2 expressam arginase que induzem as células T a produzirem citocinas semelhantes de perfil TH2) que é favorável ao parasita, por estimularem a ativação de linfócitos B, que serão diferenciados em plasmócitos para a produção de anticorpos, ou seja, produzem mecanismos de defesa contra novos agentes invasores, porém, não destroem o parasito alojado intracelular nos macrófagos (BHATTACHARYA, et al., 2015).

Os sintomas clínicos observados são decorrentes da resposta imunológica ao parasitismo, uma vez que, a partir da cascata de sinalização gerada na interação da *Leishmania* com receptores Toll-Like, há a produção de citocinas pró-inflamatórias e citocinas reguladoras, ativando seus respectivos receptores e correceptores, induzindo a formação de proteínas de fase aguda (PFA) nos hepatócitos, superexpressão de fatores teciduais nas células endoteliais e monócitos, levando à cascata de coagulação. O sintoma mais acentuado é a febre, mediada por pirógenos endógenos (IL-1 β , TNF- α e IL-6), que ao atingir o hipotálamo, liberam prostaglandinas E2 (PGE2). As PGE2 quando

elevadas, ativam o neurotransmissor AMPc, causando o aumento de temperatura hipotalâmica central (COSTA, et. al, 2023).

Além disso, algumas manifestações clínicas graves podem ser observadas como hepatoesplenomegalia, fibrose hepática intralobular difusa, comprometimento pulmonar com pneumonite e nefrite intersticial, dentre várias outras características fisiopatológicas (DUARTE, 2009). De acordo com Costa (2023), a hepatoesplenomegalia é um sinal importante no diagnóstico da doença, havendo atrofia da polpa branca esplênica, com necrose e fibrose de áreas dependentes do timo, acúmulo de macrófagos parasitados e hiperplasia de plasmócitos, gerando o aumento do baço. A cirurgia de retirada do baço tende a melhorar as condições clínicas desses pacientes, mas não cura pacientes co-infectados pelo HIV. Ainda, a hipertrofia do fígado, pode ser justificada pelo aumento da produção de células de Kupffer (COSTA, et. al, 2023).

A hepatite e a síndrome renal também podem ser encontradas na LV; no caso da hepatite, as enzimas hepáticas estão elevadas, o que indica danos aos hepatócitos e são marcadores da gravidade da doença. Os níveis aumentados de bilirrubina são fatores de risco para a morte, principalmente nos pacientes com lesão hepática. Já a presença de síndrome renal e insuficiência renal de baixo grau geralmente aumentam a letalidade da doença, porém esse quadro clínico é mais raro, e está relacionado com a nefrite intersticial, esclerose glomerular segmentar e glomerulonefrite membranoproliferativa, sendo essa lesão renal multicausal. A nefrite intersticial é suspeita de ser causada por toxicidade medicamentosa, visto que a maioria dos medicamentos antileishmania disponíveis são nefrotóxicos, mais um fator que contribui na necessidade de desenvolver novos tratamentos ou profilaxias, como por exemplo, as vacinas (COSTA et al., 2023).

No Brasil, foi definido um protocolo de atendimento desses pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS), orientando a rotina de diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes em todos os níveis de atendimento: atendimento primário, nos postos de saúde; atendimento secundário, nos centros de saúde; atendimento terciário, em hospitais (BRASIL, 2014).

O diagnóstico e tratamento da LV deve ser realizado de forma precisa e o mais precocemente possível, assim que o médico suspeitar da doença, no caso do paciente apresentar febre e esplenomegalia associado ou não à hepatomegalia em regiões endêmica. Para o início do tratamento o ideal é iniciar após confirmação parasitológica, porém, se o diagnóstico sorológico e/ou parasitológico não estiver disponível, deve-se iniciar o tratamento imediatamente. O diagnóstico imunológico pode ser feito por exames

sorológicos (imunofluorescência indireta/IFI ou *enzyme linked immunosorbent assay*/ELISA); o diagnóstico laboratorial complementar é o hemograma para avaliar presença de anemia, leucopenia com predominância de células linfomonocitárias e inversão de relação albumina/globulina; e diagnóstico parasitológico com aspirado de medula óssea e do baço para verificar a presença de amastigotas (BRASIL, 2014).

As recomendações clínicas para o tratamento da LV no Brasil, são o antimoniato N-metilglucamina (Sb^{+5}) e a anfotericina B, sendo que o primeiro pode ser administrado em ambulatório, diminuindo riscos de hospitalização; e a anfotericina é mais comumente escolhida para o tratamento de gestantes e pacientes que possuem contraindicação para os antimoniais (BRASIL, 2014).

Esses medicamentos no Brasil são distribuídos pelo Ministério da Saúde, sendo o antimoniato em ampolas de 5ml contendo 405mg de Sb^{+5} , e atua nas formas amastigotas do parasita. Porém, essa medicação possui efeitos colaterais dose e tempo dependentes, com alterações cardiovasculares (contraindicado para pacientes em uso de betabloqueadores e drogas antiarrítmicas, e em pacientes com insuficiência renal ou hepática), além de efeitos secundários como artralgias, adinamia, anorexia, dor no local de aplicação e aumento da diurese. Já a anfotericina B, é uma droga leishmanicida que atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasita (se liga com ésteres presentes na membrana plasmática da *Leishmania*), e é comercializada em sua forma liofilizada em frascos de 50mg de desoxicolato sódico da droga, e também na forma lipossomal. Os efeitos colaterais da anfotericina são inúmeros e frequentes, também dose-dependentes, e são altamente tóxicos para o tecido vascular. Além dessas drogas, também pode ser indicado a antibioticoterapia em casos de pacientes que apresentem infecções bacterianas associadas ao LV, levando em consideração as recomendações da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (BRASIL, 2014; MISHRA et al, 1994).

Apesar de haver tratamento medicamentoso, de acordo com Barbieri (2006), os fármacos utilizados ainda possuem eficácia incerta sobre a doença, e a necessidade de se obter melhores tratamentos permanece. Alternativas podem ser trabalhadas, como o controle do vetor e dos reservatórios da doença, mas por se tratar de uma doença com prevalência em regiões mais pobres, a infraestrutura necessária para esse controle não é obtida, e por isso, é reforçada a necessidade de desenvolvimento de vacinas para a imunização e possível erradicação da doença (LIMA, et al, 2010).

3.6 Desenvolvimento de vacinas

O tratamento da LV tem sido desafiador por diversos motivos: não há vacina licenciada disponível para uso em humanos; os medicamentos antileishmania possuem alta toxicidade, o tratamento tem custo elevado, e ainda houve o surgimento da resistência aos medicamentos nos parasitas. Além disso, há o aumento de casos de coinfeção por HIV, e o diagnóstico deve ser rápido e específico (PANDEY, 2019).

Visto que o tratamento para a Leishmaniose apresenta tantos aspectos negativos, é preciso aumentar e fortalecer as pesquisas para desenvolver novos fármacos e minimizar sua toxicidade, e buscar reduzir o número de novos casos de Leishmaniose, a fim de frear o avanço da doença, diminuindo a sua letalidade. Para isso são necessários métodos de prevenção, sendo a vacina o principal instrumento aplicado atualmente, para induzir imunidade protetora duradoura, reduzir a infecciosidade e/ou interromper a infecção. Além disso, algumas doenças como sarampo, caxumba, varíola, poliomielite e rubéola, foram controladas com sucesso na utilização de vacinas vivas atenuadas, sendo um método que ainda pode ser avaliado como alternativa para o desenvolvimento de outras vacinas, além de ser um método eficaz, seguro e mais econômico (SALJOUGHIAN, 2014).

De acordo com Lima e colaboradores (2010), algumas vacinas para a Leishmaniose estão sendo testadas, como vacinas de subunidades, vacinas com frações de antígeno, vacinas feitas a partir de fragmentos de DNA e vacinas com parasitas mortos pelo calor, mas ao serem testados, não alcançaram resultados satisfatórios. De acordo com a literatura, o fator mais importante para o desenvolvimento da imunidade duradoura é a persistência limitada ao parasita, e essa imunidade pode ser adquirida ao utilizar parasitas vivos atenuados nas vacinas com intuito de gerar uma forte resposta de memória no hospedeiro para prevenir uma futura infecção (BHATTACHARYA, et al., 2015).

Pandey (2019) cita que a vacina antileishmania desejável deve seguir alguns parâmetros como: perfil de segurança; acessibilidade; estabilidade; gerar imunidade protetora de longo prazo; estável em temperatura ambiente; eficaz como vacina profilática e terapêutica; eficaz contra várias espécies de *Leishmania*; vacina em dose única com imunidade robusta e duradoura. Ou seja, um desafio científico e tecnológico de escala global.

Dentre as estratégias vacinais existentes, há a “Leishmanização” (*Leishmanization*), uma das primeiras vacinas existentes, em que se inocula baixas quantidades de promastigotas vivos a partir dos exsudados de lesões cutâneas, sendo injetada no local específico. Porém, apesar de ser a única intervenção bem-sucedida contra a Leishmaniose com níveis de eficácia de até 100%, possui muitos problemas de segurança, e por isso nunca foi submetida a estudos clínicos controlados. Em paralelo,

as vacinas com parasitas mortos são seguras e alguns ensaios clínicos em humanos foram realizados, mas possuem eficácia baixa de cerca de 54% (PANDEY, 2019).

Desde 2004, quatro vacinas receberam licenciamento para Leishmaniose canina. Duas dessas vacinas, Leishmune® (que teve sua licença de produção e comercialização retirada em 2014) e Leish-Tec® (que teve comercialização suspensa em 2023), foram licenciadas no Brasil. As outras duas, CaniLeish® e LetiFend®, foram licenciadas na Europa. Apesar de estarem no mercado há anos, persistem incertezas com relação à eficácia e à efetividade dessas vacinas. Também surgem dúvidas sobre a possível infecciosidade dos animais vacinados e infectados, bem como sobre a possível interferência dos anticorpos induzidos pela vacina no diagnóstico sorológico da *L. infantum* (VELEZ; GÁLLEGO, 2020).

No Brasil, a Leishmune® é de uso exclusivo canino. Essa vacina possui um pedaço de glicoproteína purificada (*fucose-manose ligand*, FML), que consiste em um antígeno da superfície do parasita, que persiste durante seu ciclo de vida. Essa vacina inibe a penetração de promastigotas e amastigotas nos macrófagos de camundongos *in vitro*, e gerou proteção para os cães (BORJA, et al., 2002), porém o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não recomendou a utilização da vacina por falta de segurança e confiabilidade, sendo outro sinal de alerta, visto que nem a vacina canina tem alcançado o perfil desejado de segurança e proteção (CFMV, 2014).

Já a Leish-Tec® consiste em uma proteína recombinante A2 proveniente de amastigotas de *L. donovani*, combinada com saponina como adjuvante da vacina (VELEZ; GÁLLEGO, 2020). Sua fabricação e venda foram suspensas em maio de 2023 após o MAPA constatar desvio de conformidade do produto, que pode ocasionar falta de eficácia da vacina, gerando risco à saúde animal e saúde humana (BRASIL, 2023).

Para países endêmicos, a produção de vacinas a baixo custo seria o ideal, e o modelo que mais se encaixa nessa perspectiva é de vacinas de primeira geração, por serem relativamente simples, porém a padronização dessas culturas de parasitas para o desenvolvimento da vacina dificulta o processo. Outra opção são as vacinas de segunda geração com subunidades proteicas, em vista disso, subfrações parcialmente ou totalmente purificadas de *Leishmania* têm sido utilizadas em modelos experimentais, na busca de contornar as dificuldades da produção em larga escala, padronização das condições da cultura *in vitro* e procedimentos de purificação. Algumas dessas vacinas estão sendo testadas em camundongos, hamster e cães (vacinas com proteínas LPG, GP63, FML, HSP-70, HSP 83 e A2) (PANDEY, 2019).

As pesquisas mais modernas buscam a utilização de vacinas de DNA (vacina de terceira geração), para induzir uma memória imunológica, evitando respostas do tipo TH2

(que para o paciente acometido com Leishmaniose é deletéria e pode gerar uma patologia grave). A vacina Leishnavax possui eficácia profilática em camundongos, e é constituída de cinco tipos de MIDGE-TH1 (Célula T auxiliar 1 de expressão genética minimalista definida imunologicamente), cada um codifica um antígeno diferente de *Leishmania*: KMP11, CPA, CPB, P74 (fator de alongamento 1-alfa) e TSA. Da mesma maneira, um adenovírus símio com replicação defeituosa ChAd63-KH, expressa um gene sintético (KH) que codifica proteínas de *Leishmania* (KMP-11 e HASPB). É uma vacina de terceira geração, e a primeira desse tipo de vacina, que está sob ensaio clínico (KUMAR, SAMANT, 2016). Além dessas, a Leish-111f + MPL-SE (lipoproteína recombinante derivada de *Leishmania* e formulada com monofosforil lipídio A) está em ensaios clínicos em humanos, com a fase 1 e 2 de segurança completa. Apesar das inovações, nenhuma destas vacinas se demonstraram eficazes (PANDEY, 2019). Além disso, ainda não foi esclarecida como fica a expressão de proteínas durante a diferenciação do parasita, e aparentemente formas amastigotas e promastigotas não possuem um padrão antigênico semelhante, dificultando a utilização destes como alvo terapêutico. Ademais, vacinas de DNA precisam de um cuidado maior, em virtude de possíveis efeitos deletérios (KUMAR, SAMANT, 2016).

Novos avanços apontam que vacinas DCs (vacinas com células dendríticas), desempenham papel importante como imunomoduladores na vacinação, e podem ser consideradas vacinas de segunda geração. Vacinas DCs são estratégias novas com grande potencial de eficácia, mas possuem custo elevado de produção o que limitaria seu desenvolvimento em países endêmicos, necessitando de alto investimento internacional (PANDEY, 2019). Sendo assim, as vacinas vivas atenuadas geneticamente modificadas continuam sendo uma melhor opção (BHATTACHARYA, et. al, 2015), os novos conhecimentos sobre os fatores de virulência dos parasitas (Figura 4) e a compreensão dos antígenos que estimulam a resposta imunológica contra o parasita são importantes para nortear essa busca de novos medicamentos, alvos terapêuticos e no preparo das vacinas. Pesquisas que explorem esses fatores de virulência podem elucidar melhor a compreensão da patogênese da doença, auxiliando no desenvolvimento de uma nova vacina (ELMAHALLAWY & ALKHALDI, 2021).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A Leishmaniose Visceral é uma doença tropical negligenciada de suma importância, uma vez que pode ser letal, e por ser transmitida por inseto, pode ser propagada facilmente. Seus sintomas iniciais podem ser confundidos com outras doenças, sendo necessário uma boa anamnese e exames rápidos e confiáveis. Apesar de possuir tratamento e ser oferecido pelo SUS, não garante a cura da doença e

possuem muitos efeitos adversos tempo-dependentes que colocam em risco a vida do paciente, e por isso, a busca de uma vacina profilática e terapêutica deve ser priorizada, para solucionar esse problema e evitar novos casos. Vários testes com vacinas *in vitro* foram realizadas e algumas até prosseguiram para ensaios clínicos, porém, ainda estamos distantes da vacina ideal para Leishmaniose. Por se tratar de uma doença de países em desenvolvimento, os investimentos em pesquisas são escassos, porém com as novas metas de desenvolvimento sustentável da Organização Mundial da Saúde espera-se que esse quadro seja revertido, e maiores investimentos sejam fornecidos para o desenvolvimento de uma vacina. Atualmente alguns fatores de virulência do parasita já são conhecidos, assim como o mecanismo da fisiopatologia da doença, o que contribui nos avanços para um novo alvo terapêutico. Concluimos que é necessário aumentar as pesquisas a fim de driblar as dificuldades no desenvolvimento da vacina contra a Leishmaniose.

5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.A.O.et al. **Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi***. Veterinary Parasitology, v. 127, p. 227–232, 2005.
- BARBIERI, C. L. **Immunology of canine leishmaniasis**. ParasiteImmunol. 2006; 28: 329-3.
- BHATTACHARYA, P. et. al. **Genetically Modified Live Attenuated *Leishmania donovani* parasites induce immunity through classical activation of macrophages that direct the Th1 response in mice**. Infection and Immunity, Vol 83, N10, October 2015.
- BORJA-CABRERA, G.P; et. al. **Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN)**. Vaccine. 2002; 20: 3277-84
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contr-leishmaniose-apos-fiscalizacao>>. Acesso em: 24 nov. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**; 5º reimpressão, Brasília, DF, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**, Brasília: Ministério da Saúde, 2011.78 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.60 p.

BRITO, R. C. F, et. al. **Recent Advances and a New Strategies in Leishmaniasis Diagnosis**. Applied Microbiology and Biotechnology, May 2020.

CDC. **Leishmaniasis**. Centers for Disease Control and Prevotion, 2017, Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC - DPDx - Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>>. Acesso em: 23 nov. 2023.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Ministério da Agricultura suspende vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina**. Disponível em: <<https://www.cfmv.gov.br/ministerio-da-agricultura-suspende-vacina-contra-a-leishmaniose-visceral-canina/comunicacao/noticias/2014/11/18/#:~:text=Minist%C3%A9rio%20da%20Agricultura%20suspende%20vacina%20contra%20a%20Leishmaniose%20Visceral%20Canina,-18%2F11%2F2014&text=18%20de%20novembro%20de%202014,da%20empresa%20Zoetis%20Sa%C3%BAde%20Animal.>>. Acesso em: 24 nov. 2023.

COSTA DA SILVA, A. C. et. al, **Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview**. Tropical Medicine and Infectious Disease. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>> , 2022.

COSTA, C. H.N; Chang, K.-P; Costa, D.L; Cunha, F.V.M. **From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis**. Pathogens 2023, 12, 969. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070969>

DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. **Leishmaniose visceral (calazar)**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 1707-36.

ELMAHALLAWY, E. K & ALKHALDI, A. A. M. **Insights into Leishmania Molecules and Their Potential Contribution to the Virulence of the Parasite**. Veterinary Sciences. Vet. Sci. 2021, 8, 33. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vetsci8020033>> .

ESTRADA R. A. **Leishmaniose Visceral –Uma zoonose re-emergente**. Disponível em: [http:// www.qualittas.com.br/artigos/artigo.php?artigo_id=399](http://www.qualittas.com.br/artigos/artigo.php?artigo_id=399). jul, 2011

FIOCRUZ, **As leishmanioses**. Laboratório de imunomodulação, Departamento de Protozoologia, Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm> Acesso em: Setembro, 2023.

FIOCRUZ, **Atlas reúne conhecimento sobre leishmanioses**. Disponível em: <<https://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=3548&sid=32&tpl=printerview>>. Acesso em: outubro, 2023.

FIOCRUZ, **Doenças Negligenciadas**. Agência Fiocruz, 2023. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: setembro 2023.

FORESTIER, C. L. & BOONS, G. J. **Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Volume 4, article 193,

January 2015.

GOMES, A. C. A, et al. **Leishmaniose muco-cutânea: relato de caso clínico.** Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, v. 4, n.4, p.223-228, out/dez, 2004.

GONÇALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H. **Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by Trypanosoma cruzi in mice.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981; 76: 367-81.

KHALAIFAH, H. S. **Major Molecular Factors Related to Leishmania Pathogenicity.** Frontiers In Immunology, Volume 13, Article 847797, June 2022.

KUMAR, A.; SAMANT, M. **DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control.** Parasite Immunol. 2016 May;38(5):273-81. doi: 10.1111/pim.12315. PMID: 27009772.

LIMA, V. M. F, et. al. **Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmune® in an endemic area for visceral leishmaniasis.** Vet Immunol Immunopathol. 2010; 135: 296-302

LINDOSO, J. A. L; MOREIRA, C. H. V; CUNHA, M. A; QUEIROZ, I. T. **Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives.** HIV AIDS (Auckl). 2018 Oct 15;10:193-201. doi: 10.2147/HIV.S143929. PMID: 30410407; PMCID: PMC6197215.

MCGWIRE, B. S, et. al. **Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease GP63.** Infection and Immunity, Feb 2003, p. 1008-1010.

MISHRA, M. et al. **Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar.** Lancet, v. 344, n. 8937, p. 1599-1600, Dec. 10 1994.

NASCIMENTO, B. W. L. **Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.** Dissertação MDIP, Belo Horizonte, 2013.

OPAS, **Atlas Interativo de Leishmanioses nas Américas - Aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais.** Organização Pan-Americana da Saúde, Washinton, D. C, 2021.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>> Acesso: outubro, 2023.

PANDEY, S. C.; KUMAR, A; SAMANT, M. **Genetically modified live attenuated vaccine: A potential strategy to combat visceral leishmaniasis.** Parasite Immunology, November 2019. DOI: 10.1111/pim.12732

PERES, N. T. A. et al. **Infection of human macrophages by Leishmania infantum is influenced by Ecto-Nucleotidases.** Frontiers in Immunology, volume 8, article 1954, January 2018.

ROCHA, L. **Leishmanioses: conheça os insetos transmissores e saiba como se prevenir.** FIOCRUZ, Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/leishmanioses-conheca-os-insetos-transmissores-e-saiba-como-se-prevenir>>, Agosto de 2019.

SALJOUGHIAN, N. TAHERI, T; RAFATI, S. **Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis.** Front Immunol. 2014;5:134.

SBP, Sociedade Brasileira de Parasitologia, **Reservatório.** Disponível em:

<https://www.parasitologia.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=431>. Acesso em: Outubro, 2023.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 18 jul. 2016.

SILVA, K. L. O, et. Al. **Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão**. Arch Health Invest (2013) 2(4): 18-28. ISSN 2317-3009.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. **Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals**. Parasites & Vectors, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA. **Sociedade Brasileira de Parasitologia - Glossário - R**. Disponível em:

<https://www.parasitologia.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=431#:~:text=Reservat%C3%B3rio%3A%20%C3%A9%20qualquer%20local%2C%20vegetal,capaz%20de%20atingir%20outros%20hospedeiros.>. Acesso em: 23 nov. 2023.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 5, p. 540–557, 2 mar. 2020.

WHO, World Health Organization. **Integrating Neglected Tropical Diseases Into Global Health and Development**. Disponível em: <https://who.int/neglected_diseases/en> , 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators**. Disponível em:

<<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>>. Acesso em: 23 nov. 2023.

ZACARIAS, D. A., et. al. **Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients**. Tropical Medicine and International Health, vol 22, n6, pp 679-687, June 2017.