

LEISHMANIOSE



Porque estudar leishmaniose?

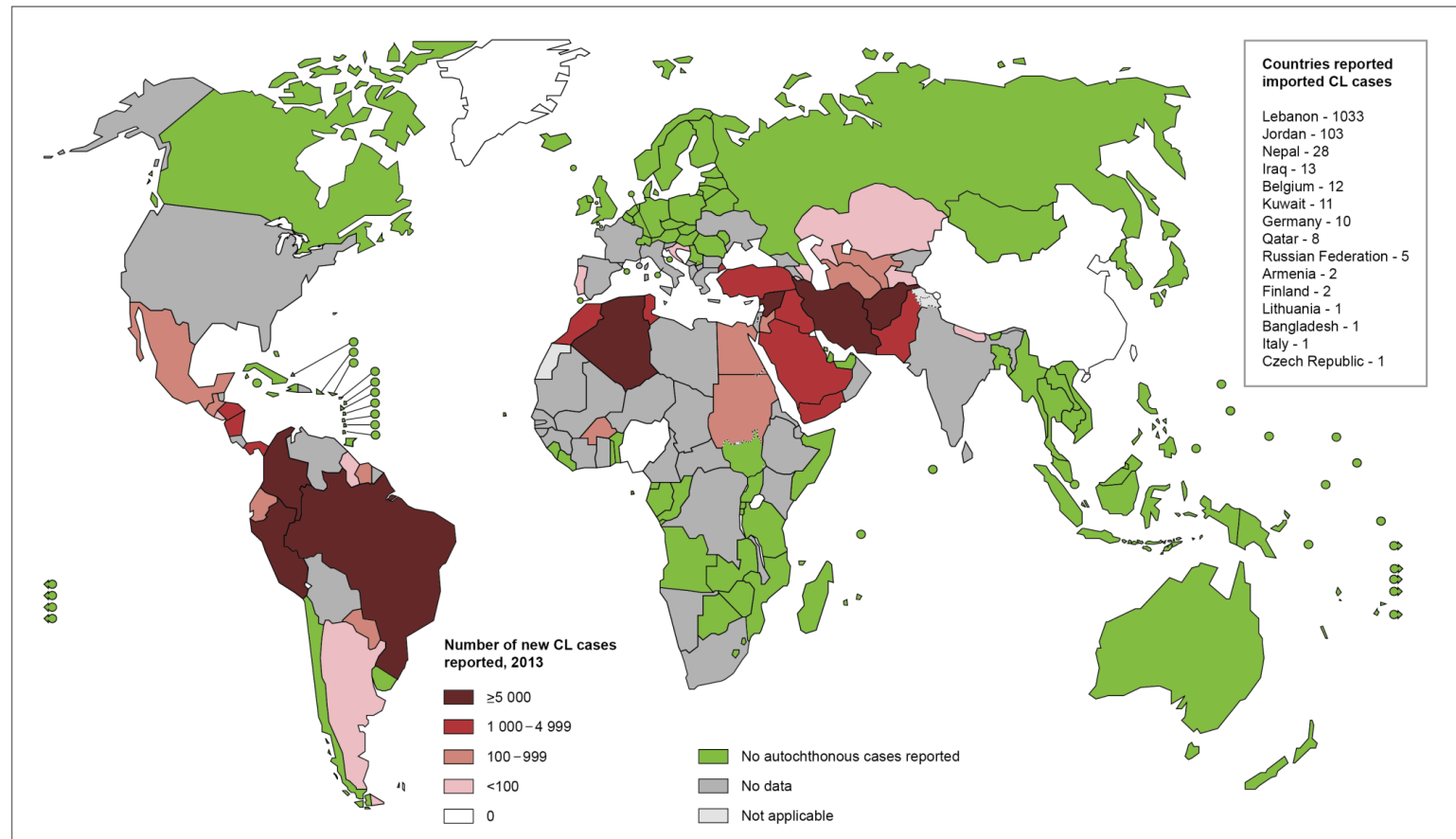
Grande endemia: 98 países

~12 milhões pessoas estão infectadas (2mi/ano)

350 milhões de pessoas ameaçadas de infecção

Alta incidência no Brasil

Distribuição Geográfica da Leishmaniose Cutânea (Tegumentar)



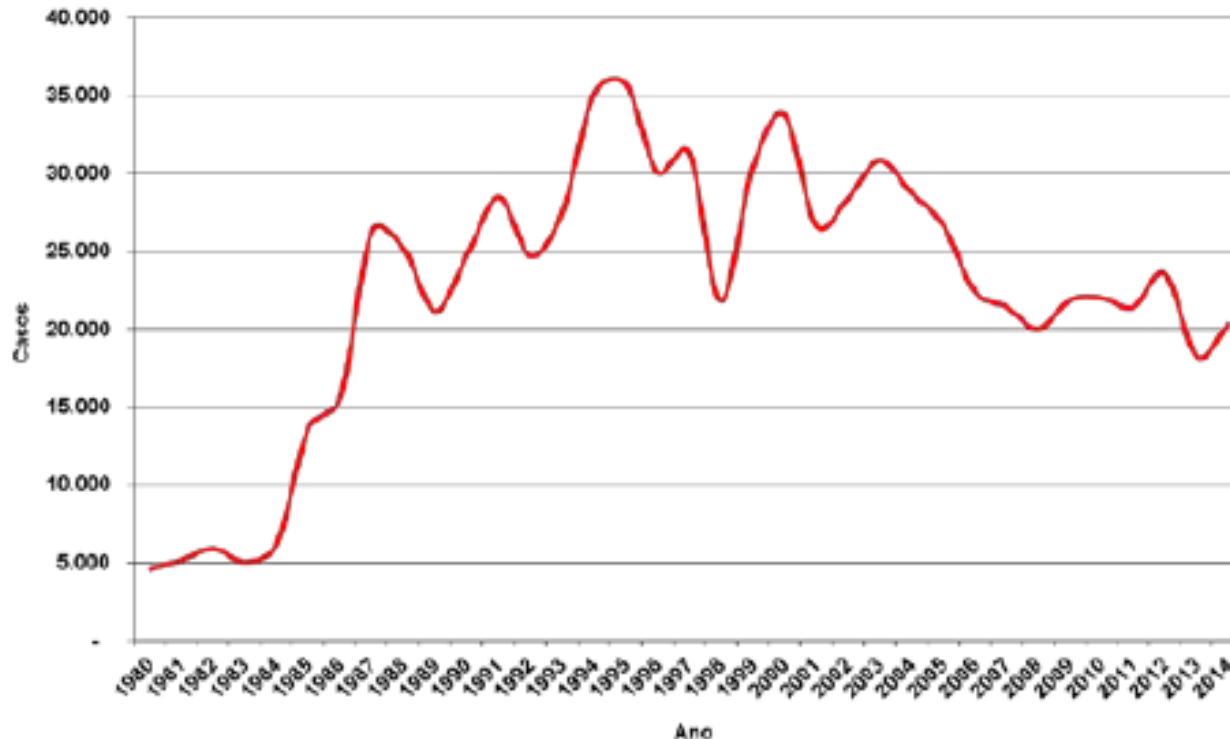
1,5 milhão de casos novos por ano (2013)



90% cutâneas: Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria
90% mucosas: Bolívia, Brasil, Peru
1300-2500 soldados americanos com LC após Afeganistão e Iraque

Leishmaniose Tegumentar no Brasil

Figura 1 – Casos confirmados de leishmaniose tegumentar, Brasil – 1980 a 2014



Fonte: SVS/MS.

25.000-30.000 casos por ano

33000 casos em 2000

21000 casos em 2010

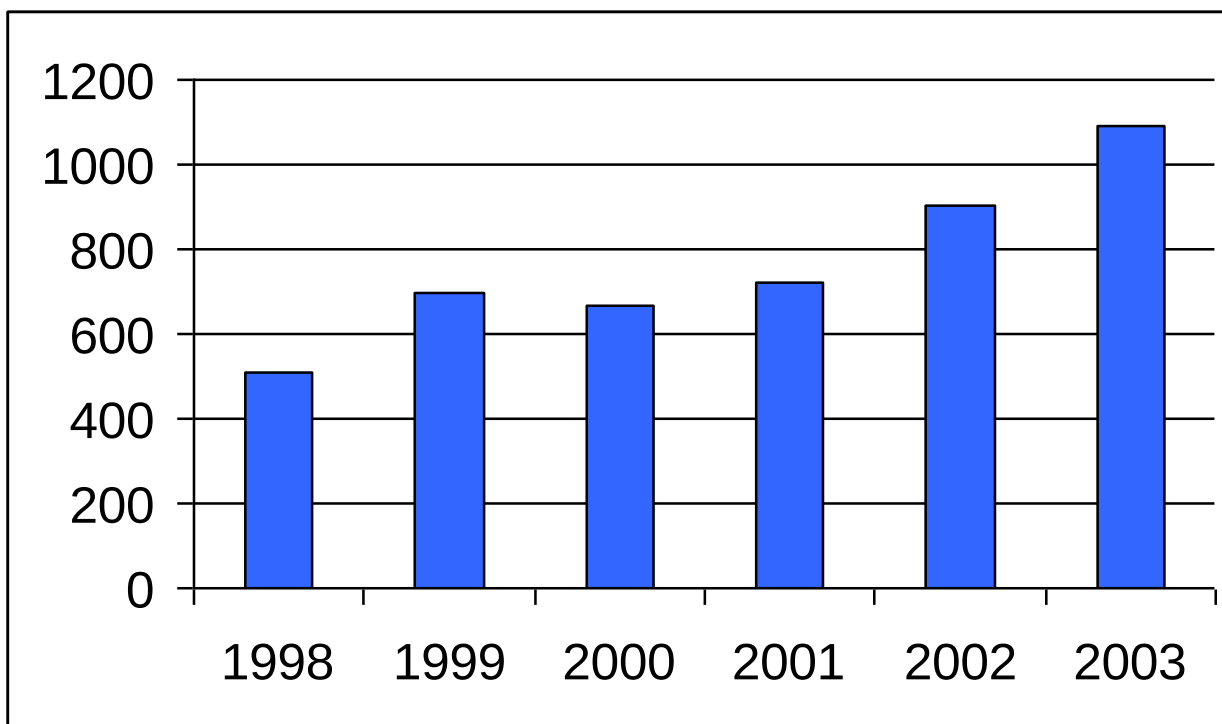
20296 casos em 2014

Leishmaniose Tegumentar no Brasil

2015



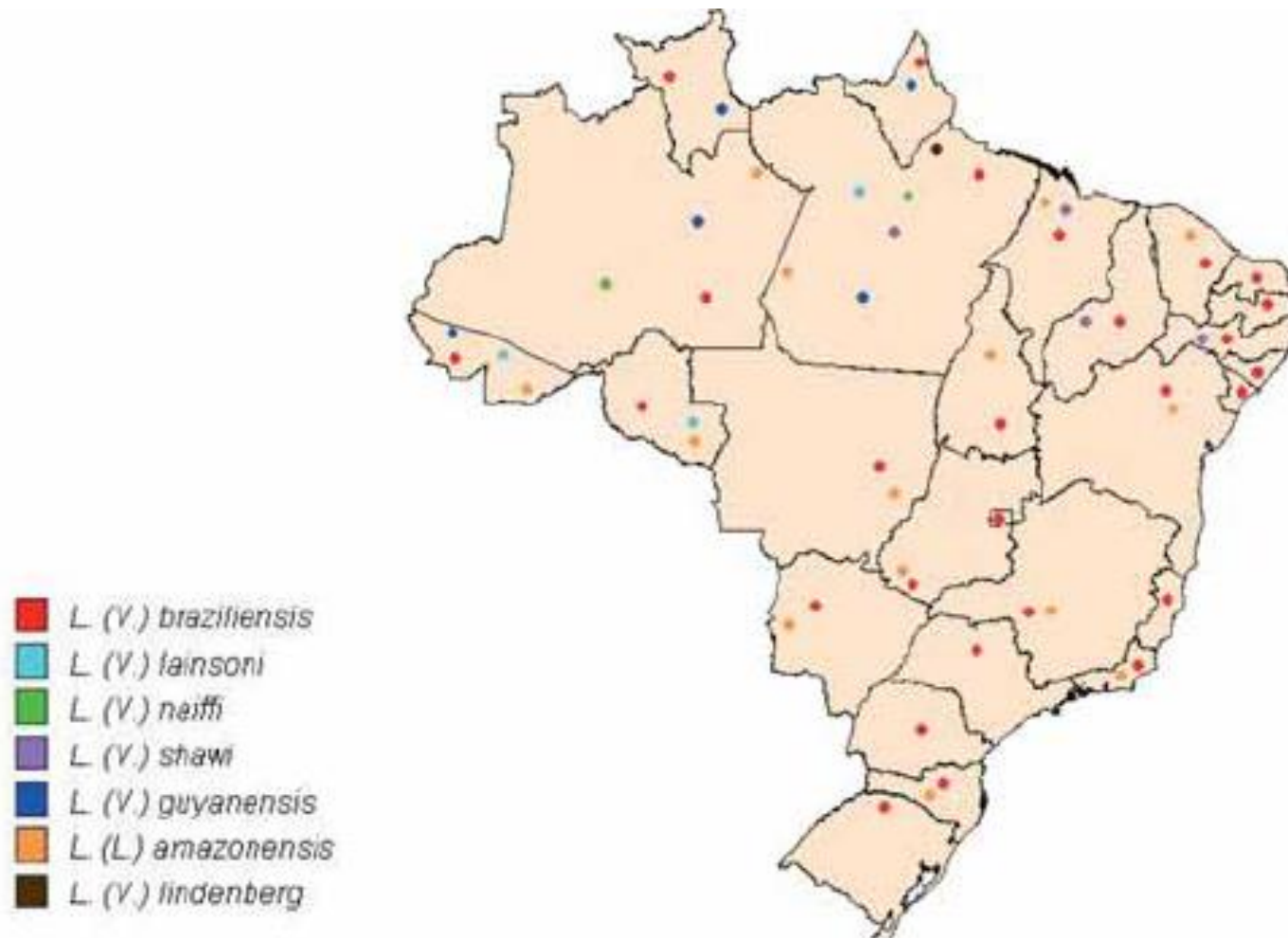
Leishmaniose cutânea - Estado de SP



SUCEM

Principais agentes da LTA no Brasil:

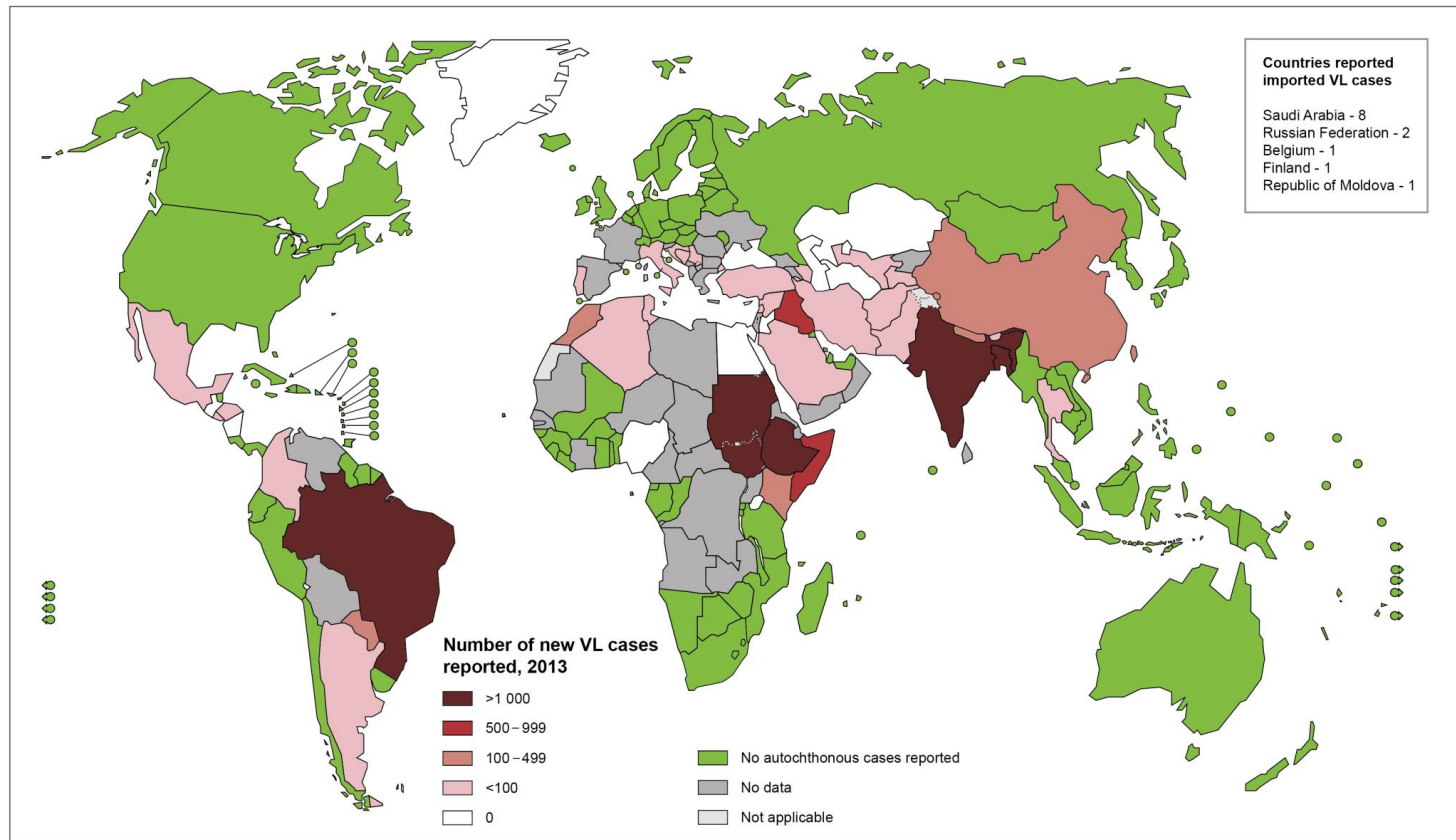
Leishmania (V.) braziliensis, *L.(L.) amazonensis*



Fonte: SVS/MS

2005

Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral



~500.000 casos novos por ano

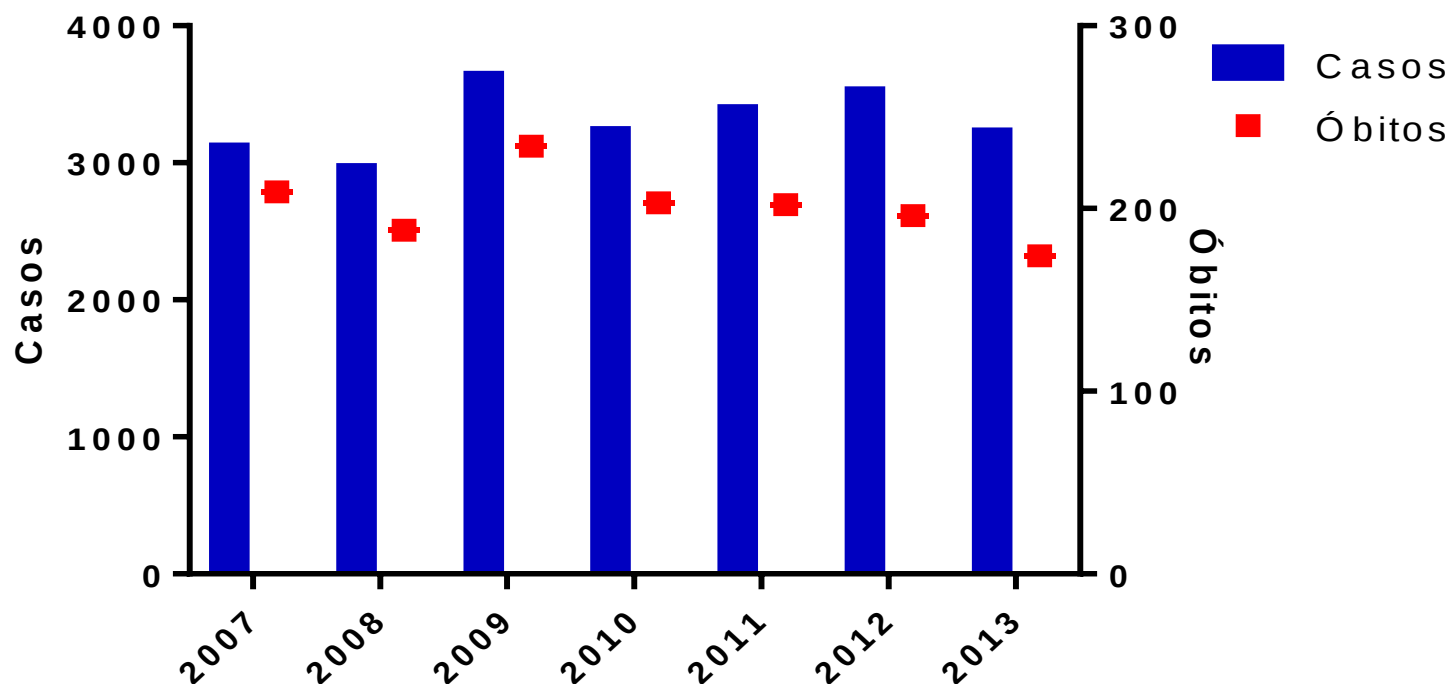
(2013)



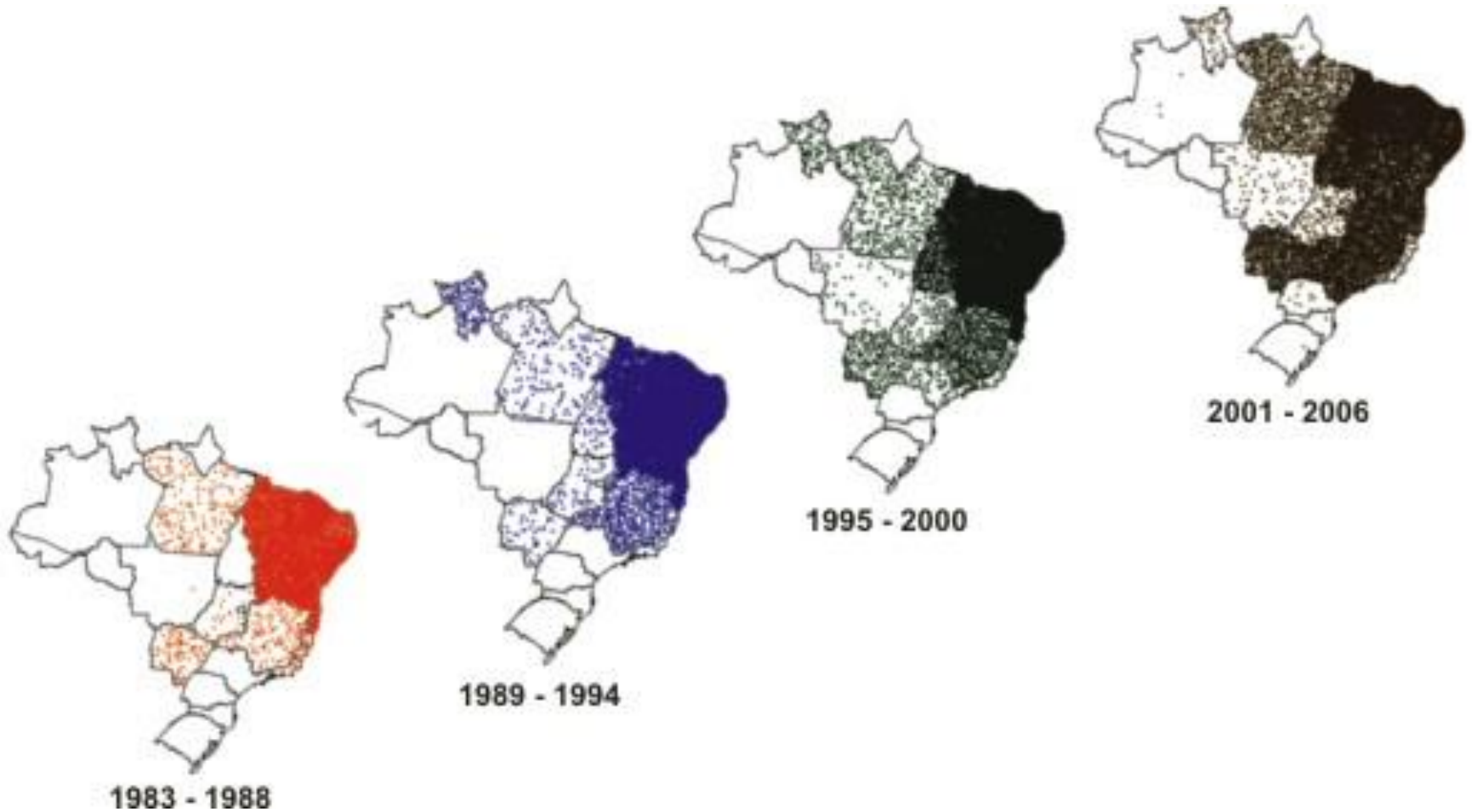
90% viscerais: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão

Índia: 50% dos casos do mundo; Bihar (rural): 90% dos casos indianos

Leishmaniose Visceral no Brasil



Leishmaniose Visceral no Brasil





1983 - 1988

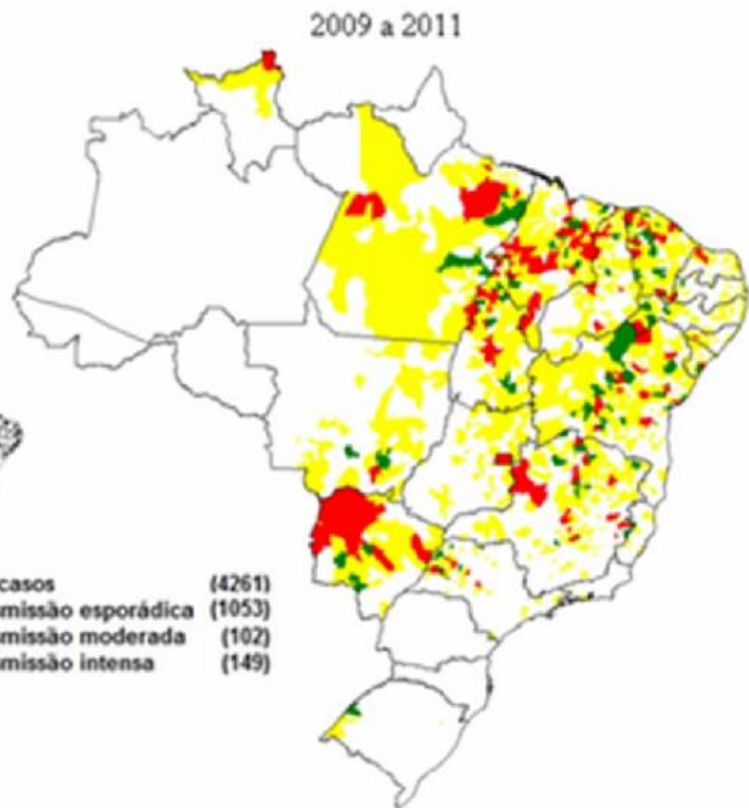


1989 - 1994



2000 - 2009

- Sem casos (4261)
- Transmissão esporádica (1053)
- Transmissão moderada (102)
- Transmissão intensa (149)



2009 a 2011

7 de abril de 1999

Araçatuba registra 1º caso de leishmaniose

ARAÇATUBA - A Secretaria Estadual da Saúde registrou o primeiro caso de leishmaniose em um ser humano na cidade de Araçatuba, a 540 quilômetros da capital.

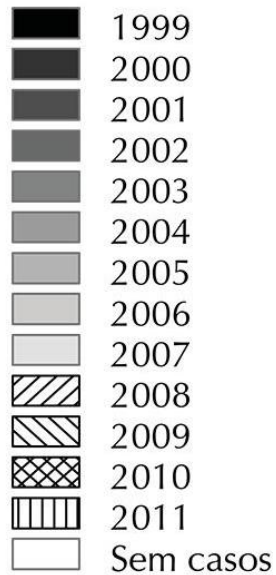
DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS, ÓBITOS e LETALIDADE DE LVA HUMANA- ESTADO DE SÃO PAULO - 1999 a 2004*

ANO	Nº CASOS	Nº ÓBITOS	LETALIDADE
1999	17	5	29,4
2000	15	-	-
2001	57	3	5,3
2002	114	13	11,4
2003	146	21	14,4

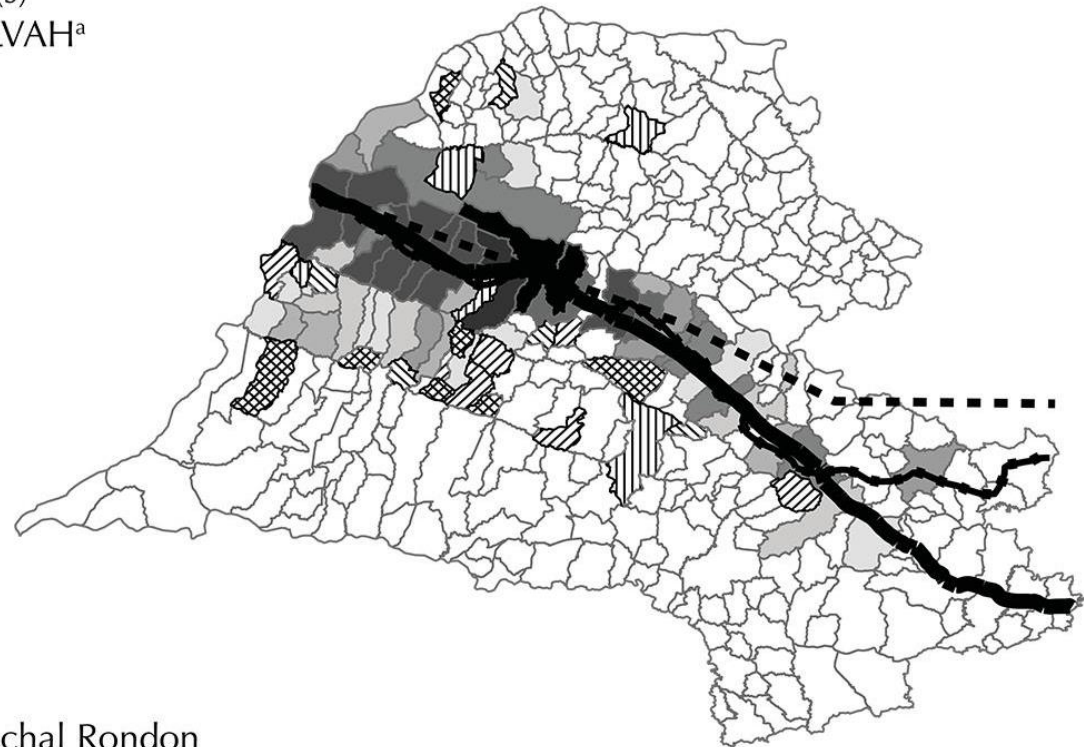
*dados provisórios até 18/07/04

Fonte : Divisão de Zoonoses/CVE

Ano de detecção do(s)
primeiro caso(s) de LVAH^a



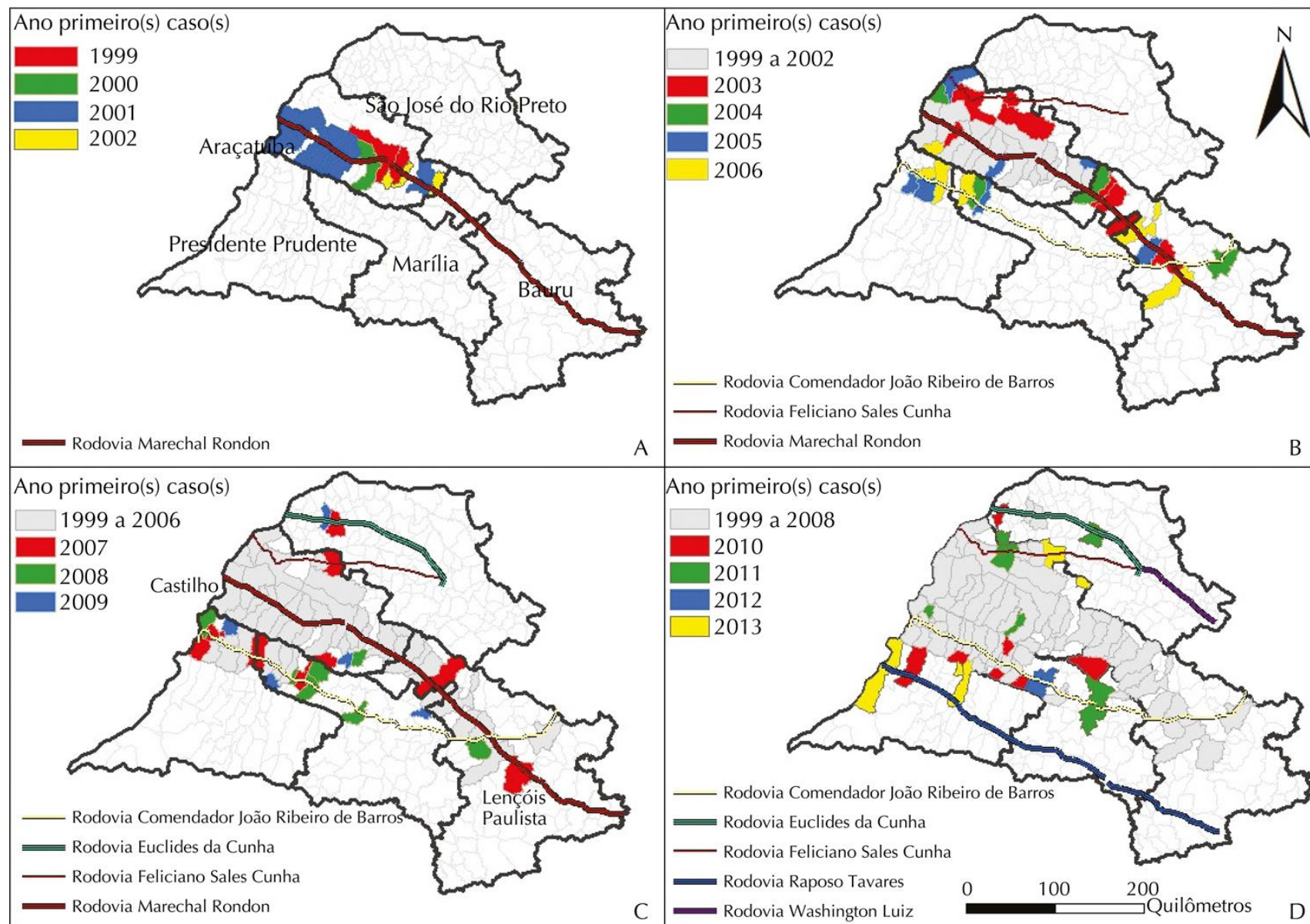
 Rodovia Marechal Rondon
 Ferrovia Novoeste
 Gasoduto Bolivia-Brazil



0 150 300 km

^aLVAH: Leishmaniose visceral americana em humanos

Avanço em direção a SP: Gasoduto Brasil- Bolívia, migrações (30km/ano)



Folha de São Paulo, 4 março 2018

SAÚDE

Leishmaniose se espalha pelo estado de SP e avança para capital

Doença chegou a Guarujá em 2016, a 400 km das regiões tradicionalmente endêmicas



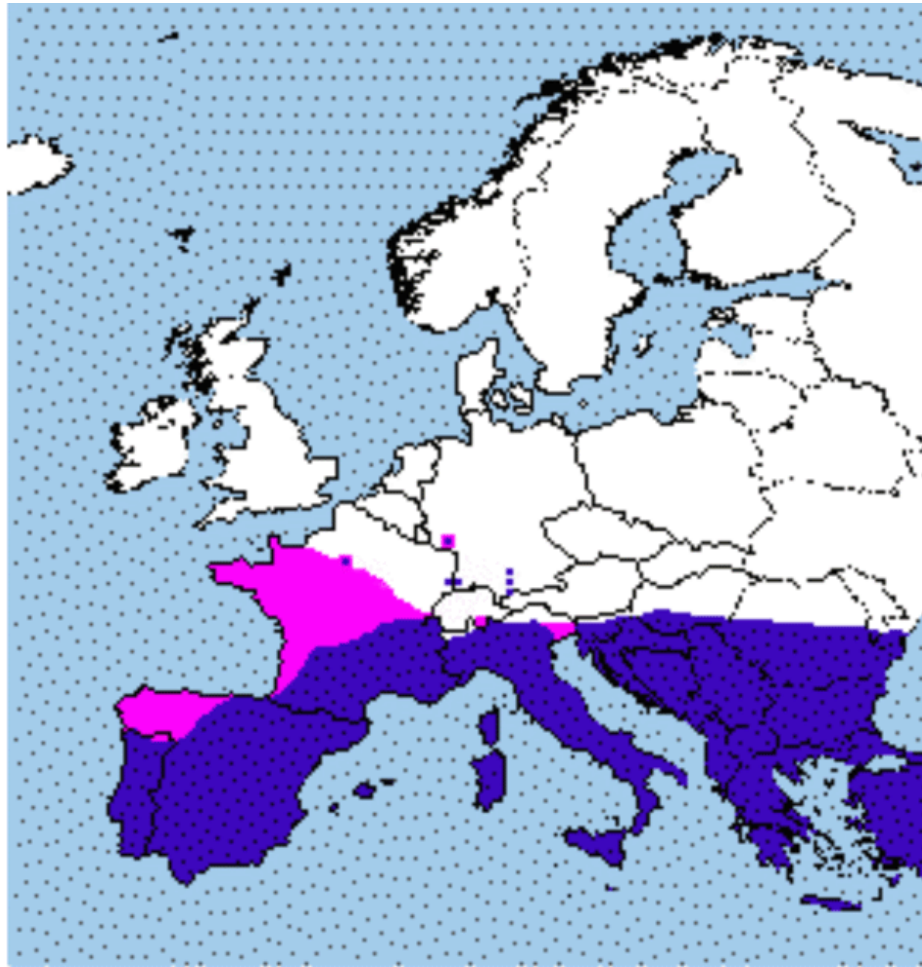
Cláudia Collucci

SÃO PAULO

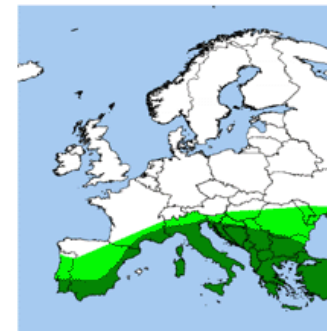
A leishmaniose visceral, doença causada por parasita transmitido ao homem pela picada de mosquitos (especificamente, flebotomíneos), se espalhou pelo estado de São Paulo e avança para a capital.

Apesar de o número de casos estar em queda no país como um todo, a preocupação é que a doença atinja um número cada vez maior de municípios paulistas.

Leishmaniose Visceral na Europa



Cutânea



Blue = distribution of visceral leishmaniasis

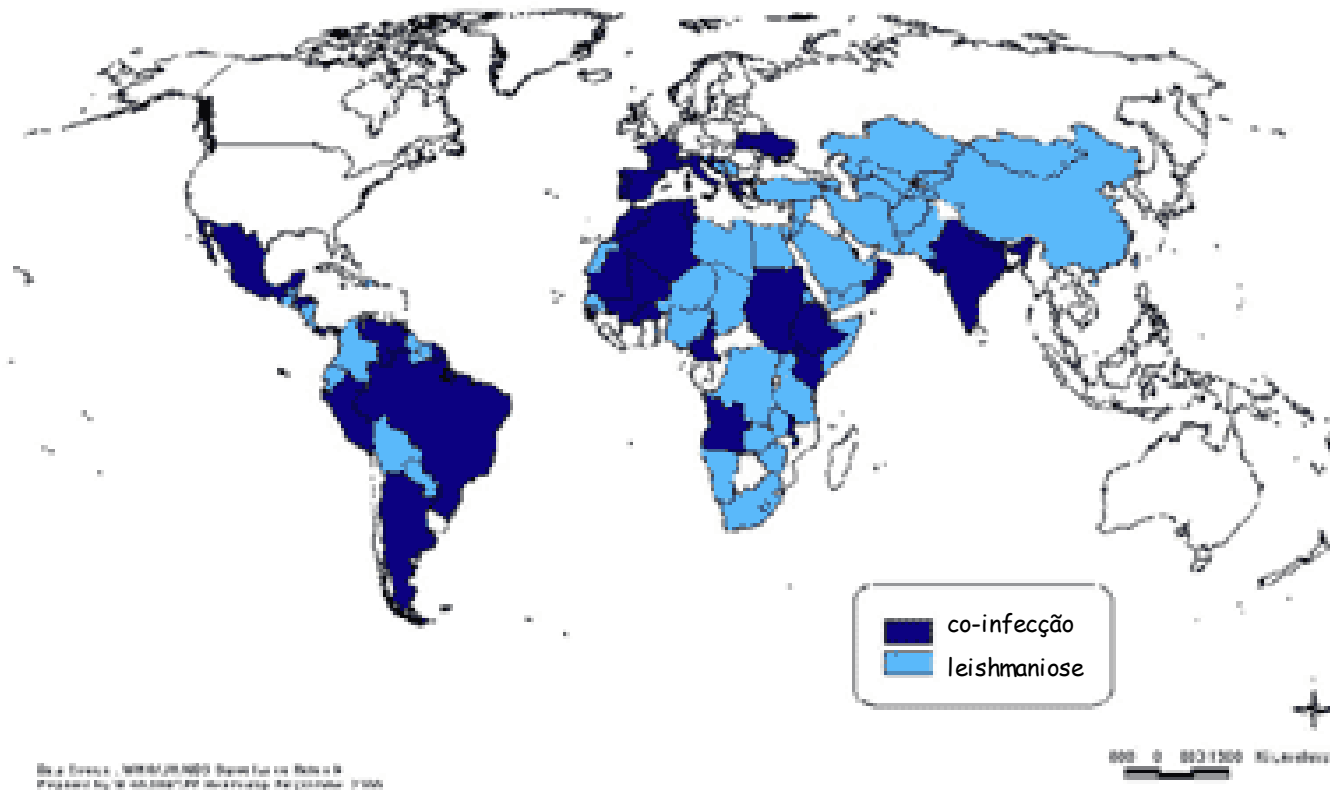
Red = distribution of the visceral leishmaniasis vector sandflies

Dark green = distribution of cutaneous leishmaniasis

Light green = distribution of cutaneous leishmaniasis vector sandflies

Distribuição geográfica leishmaniose visceral/AIDS

34 Countries Reporting Leishmania / HIV Co-Infection Worldwide



Associação entre leishmaniose visceral e AIDS

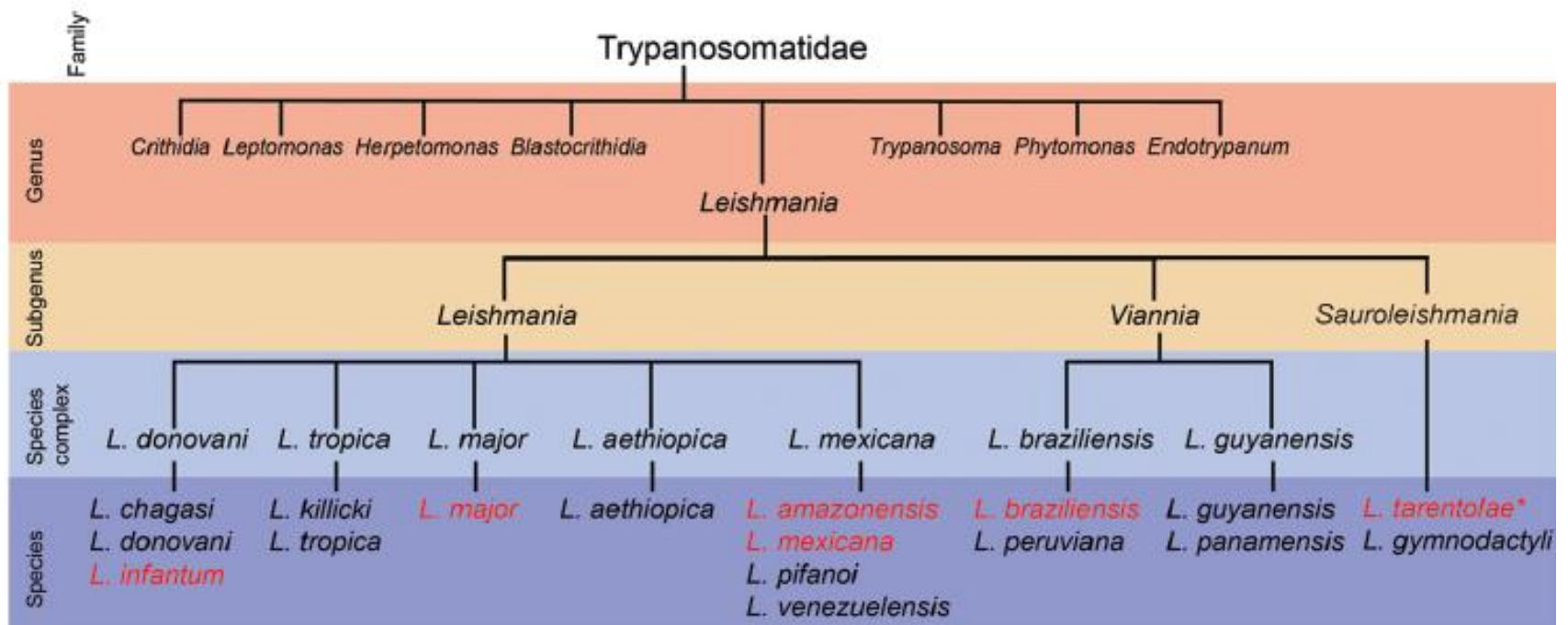
Leishmaniose visceral acelera AIDS

HIV ativa leishmaniose em portadores antes assintomáticos

Sul da Europa: até 70% indivíduos com leishmaniose visceral tem HIV (drogas) (WHO, 2009)

O PARASITA

Ordem Kinetoplastida (cinetoplasto) Família Trypanosomatidae



Real et al., 2013

Ancestral de tripanosomatídeos: parasita de insetos

Gênero *Leishmania*

Sub-gêneros *Leishmania*
Viannia



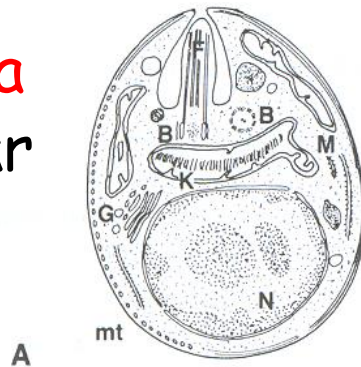
Classificação com base na diferenciação no tubo digestivo do inseto:

- *Leishmania* no intestino anterior e médio
- *Viannia* no anterior, médio e posterior

Outras diferenças: genoma, RNAi, vírus de RNA...

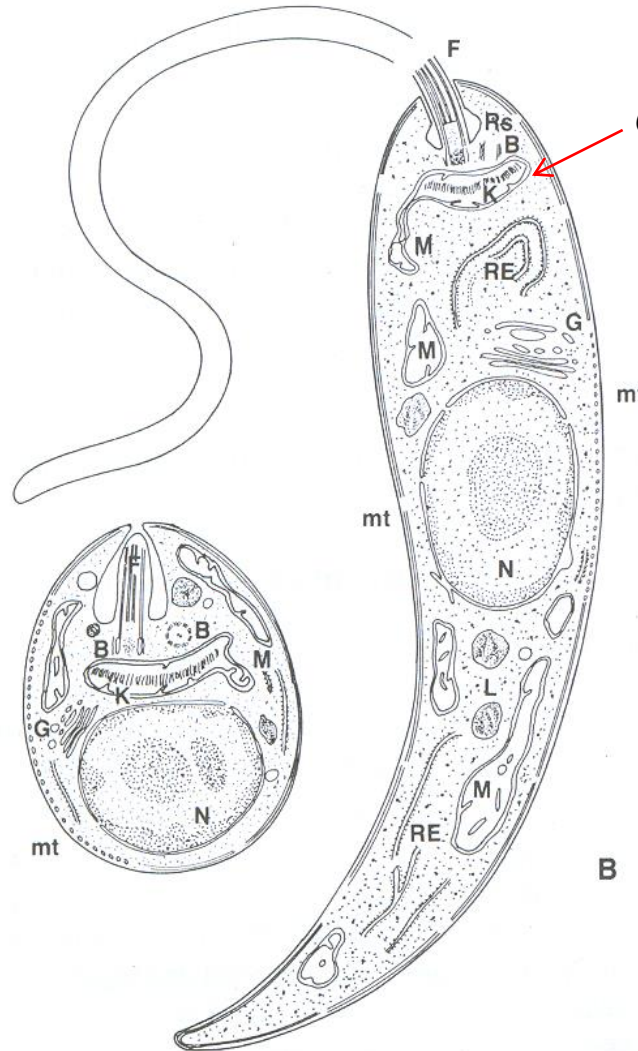
FORMAS DO PARASITA

Amastigota
Intracelular
(2-6 μm)



CINETOPLASTO

Promastigota
Vetor, cultura
(14-20 μm)



Bactéria ~ 0,5 μm , linfócito ~ 12 μm

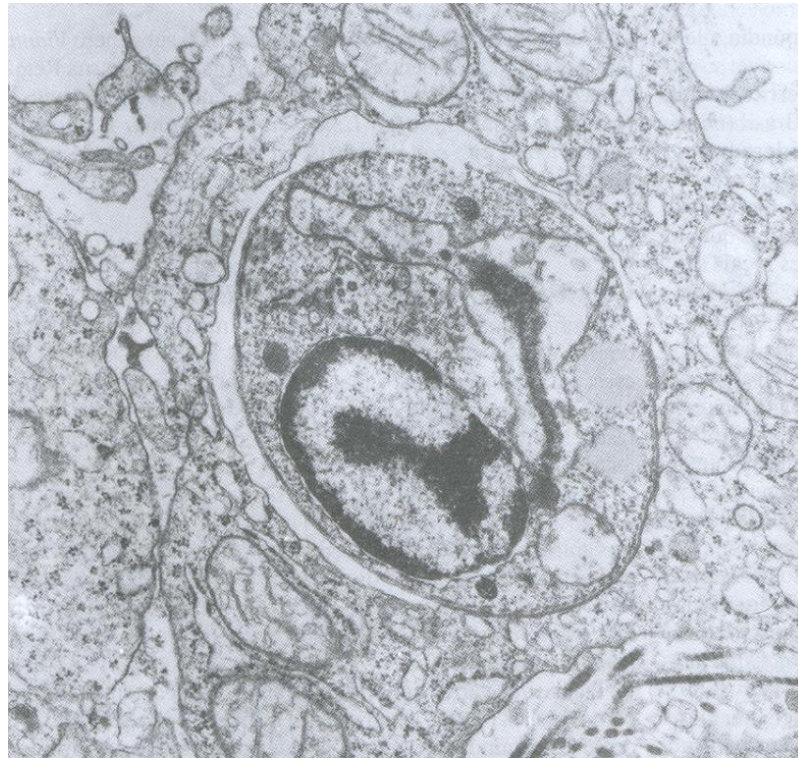
Promastigota



Reprodução por fissão binária no inseto vetor
Forma invasiva: promastigota metacíclico

Amastigota

Fagocitado por células do sistema mononuclear fagocítico:
macrófagos, neutrófilos, células dendríticas
Reprodução por fissão binária



ESPÉCIES DO GÊNERO LEISHMANIA

Mais de 20 espécies patogênicas ao homem

Evolução clonal- spp separadas há 15-50 milhões de anos,
2,5% genes espécie-específicos

Espécies morfológicamente semelhantes (exceções)

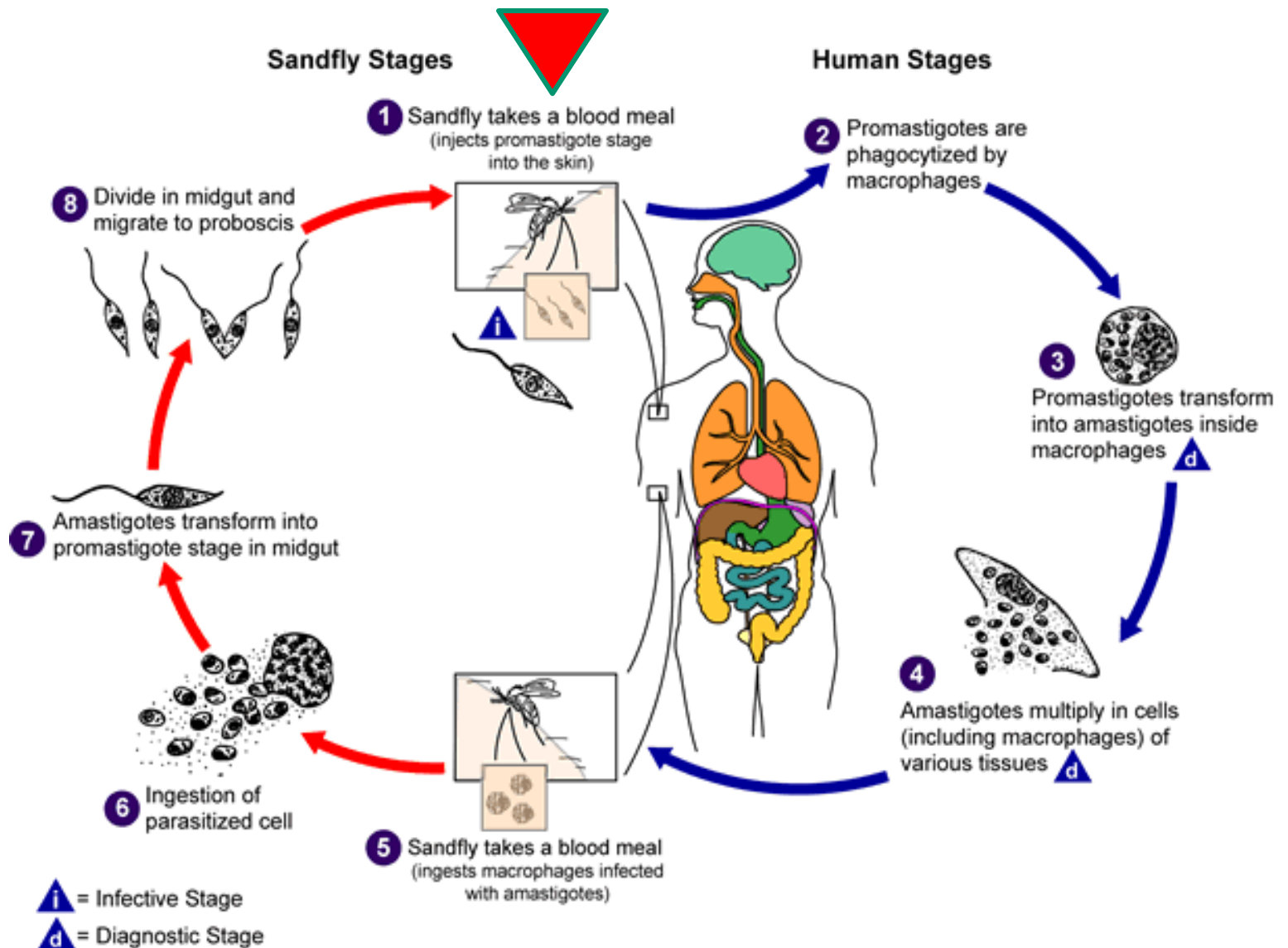
Transmitidos por diferentes espécies de vetores-
compatibilidade vetorial

Infectam diferentes hospedeiros vertebrados

Diferem quanto as moléculas de adesão, fatores de
virulência e formas clínicas

Identificadas por métodos moleculares

CICLO



VETORES

Flebotomíneos- Ordem Phlebotominae

5 gêneros e 700spp

30spp são vetores de leishmaniose



Lutzomyia nas Américas

Phlebotomus na África,
Europa e Ásia

“**Mosquito (!)** palha”, birigui

VETORES

2-3mm, corpo e asas peludas

Marrons "luminosos" (oleosidade)

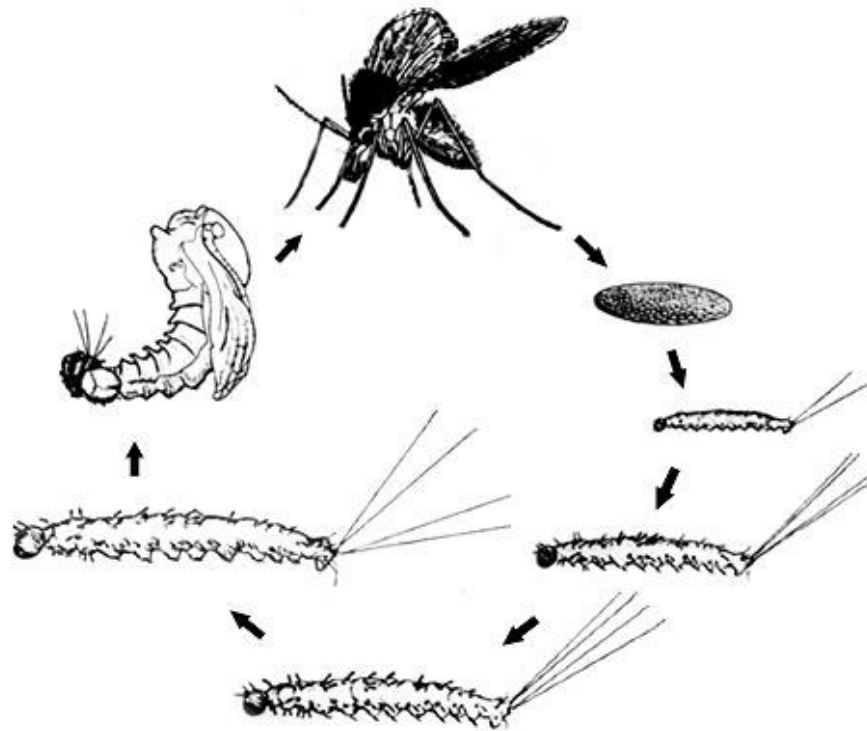
Asas em V

Regiões tropicais e temperadas (20 a 30°C)

A **fêmea** se alimenta de sangue ao entardecer/noite, vôo curto (até 100m), baixo e direto

Picada dolorida- "bebem" sangue da ferida

VETORES



Ovo- adulto: 4 a 7 semanas, Adulto vive 15 a 30 dias

Larvas e pupas: habitat úmido, quente e com nutrientes

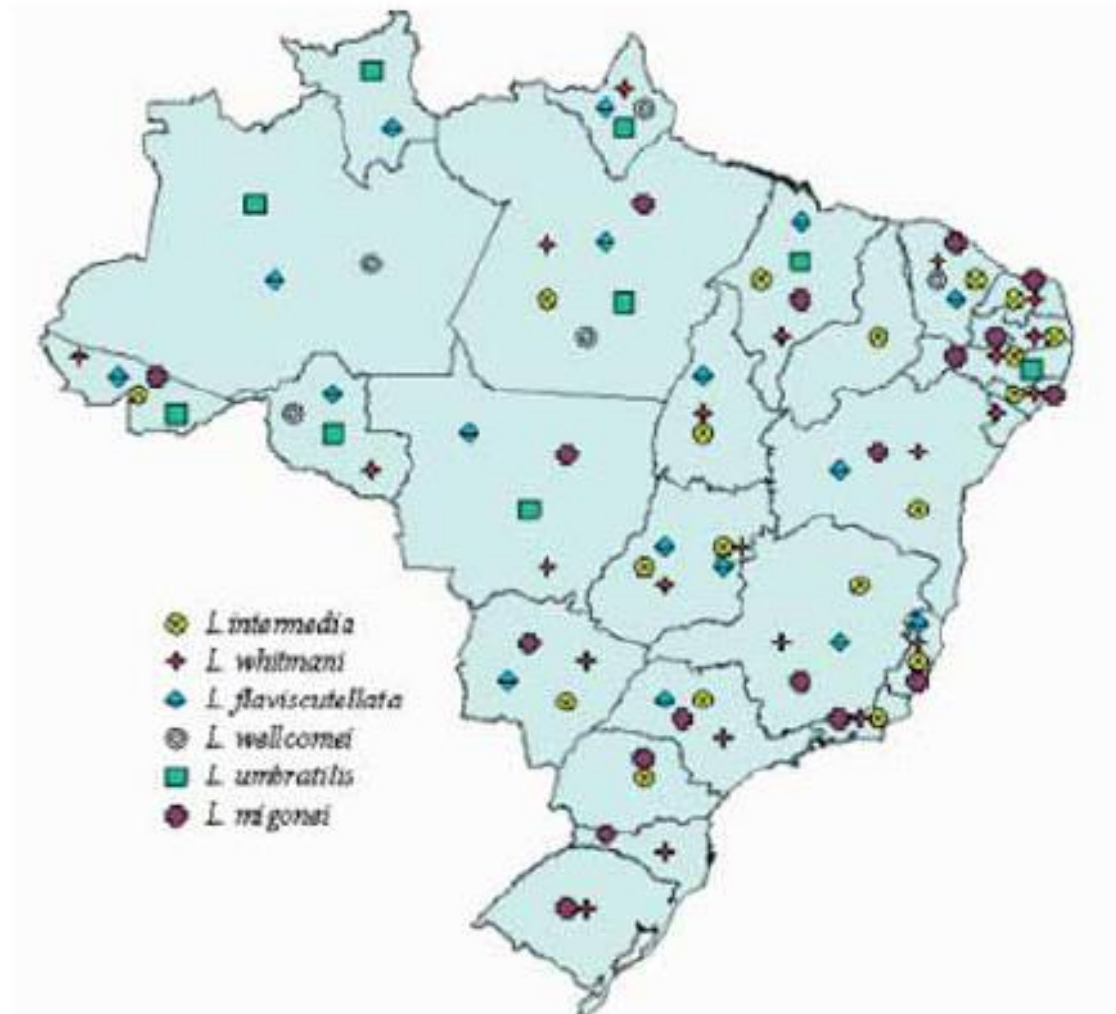
Difícil encontrar locais de desova, larvas e pupas: difícil controle!

VETORES



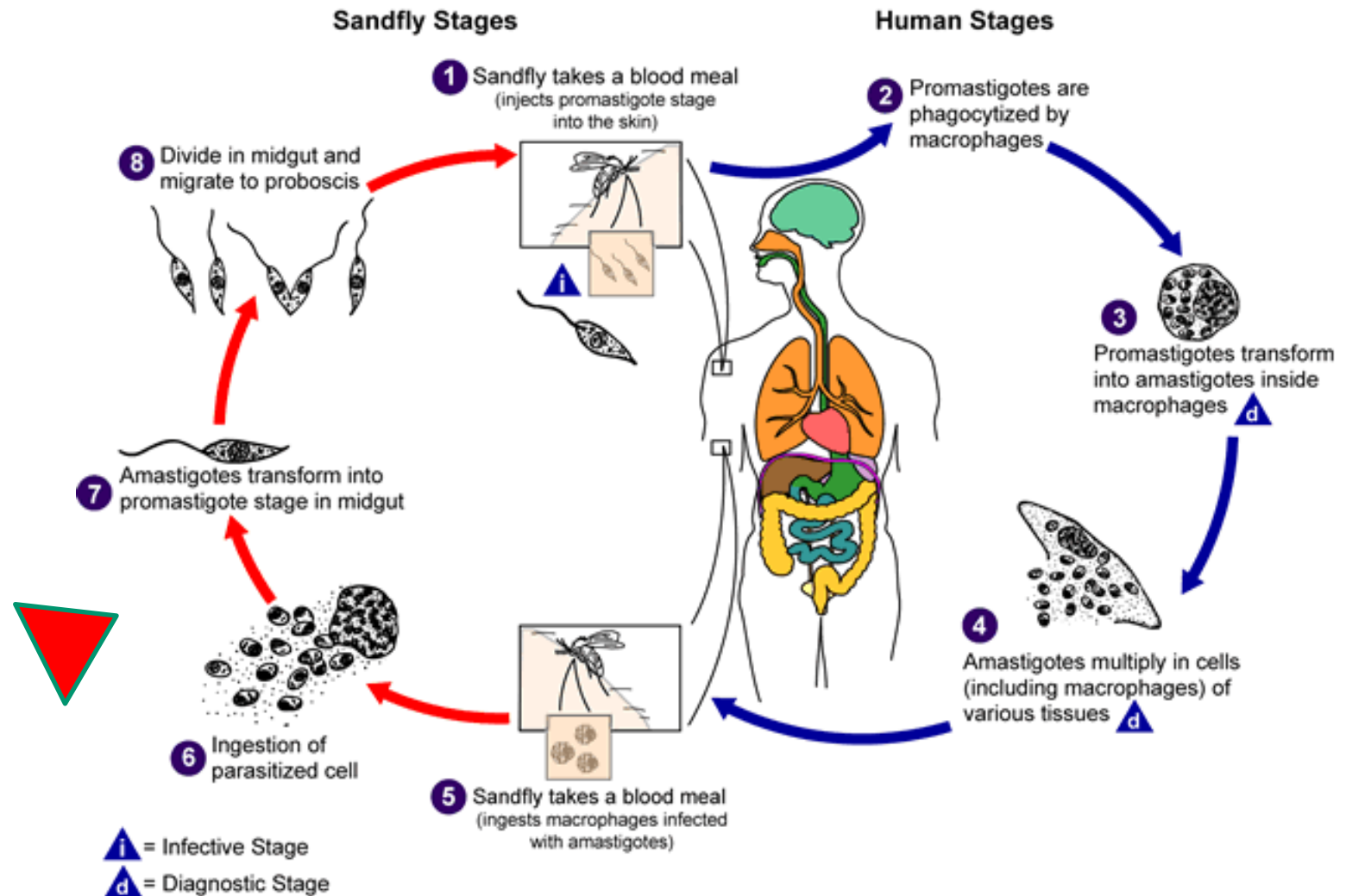
Habitat silvestre/peri-domiciar: lixos e escombros, rachaduras externas de habitações, solo úmido em matas ou florestas, cascas de árvores, tocas de roedores silvestres

Vetores de leishmaniose tegumentar no BR

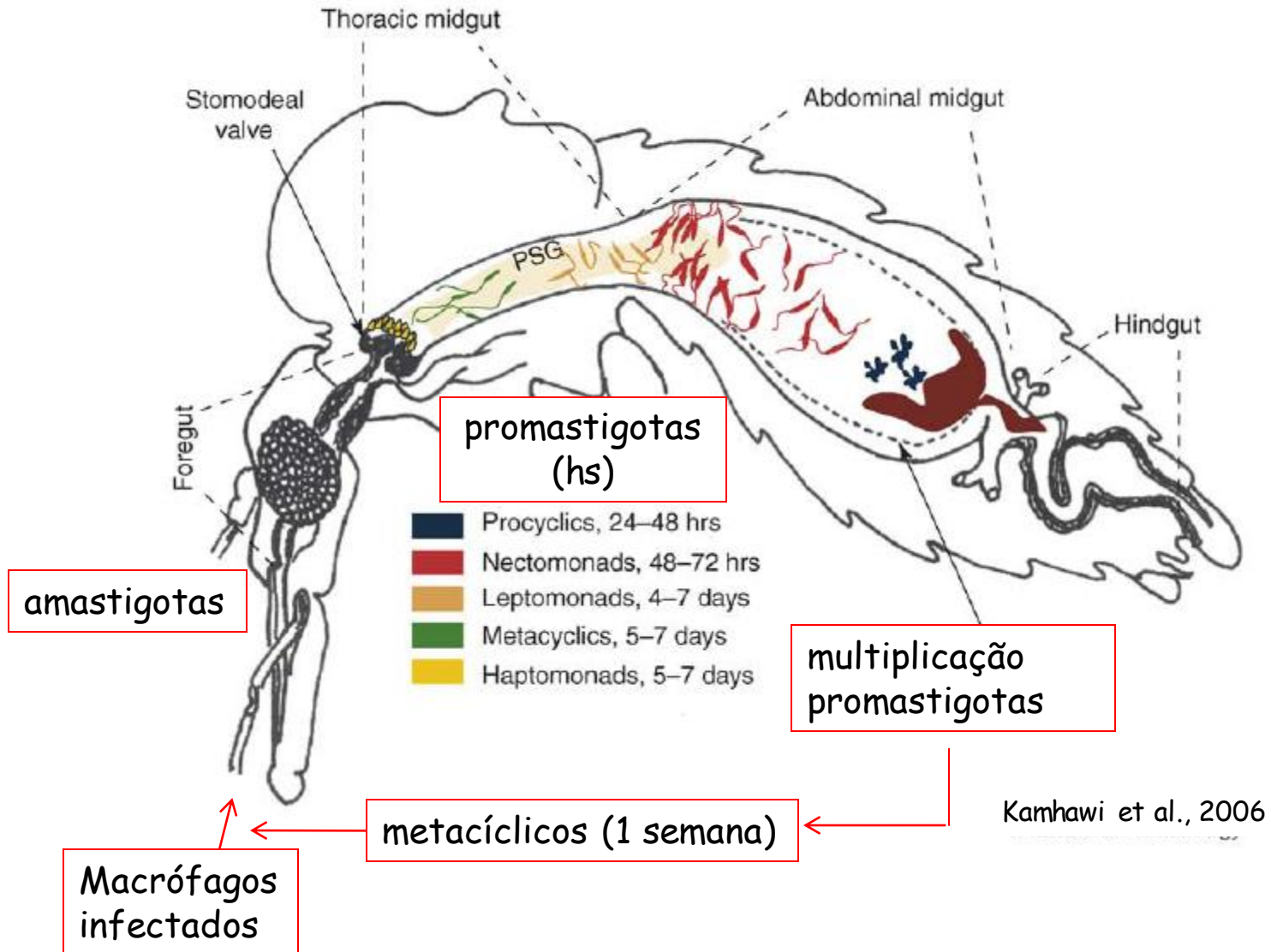


Leishmaniose visceral: *Lutzomyia longipalpis*

CICLO



DESENVOLVIMENTO NO VETOR



Desenvolvimento no vetor: aproximadamente 10 dias

<http://www.youtube.com/watch?v=kRRlapcxDFs>

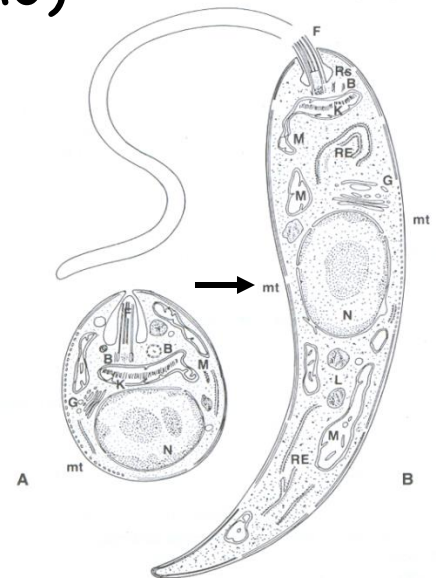
TRANSFORMAÇÃO AMASTIGOTA-PROMASTIGOTA

Alterações do microambiente: do fagolissofoma (ácido e rico em nutrientes) ao intestino do inseto

Cresce 5 vezes

Desenvolve um flagelo (1 a 2 vezes seu tamanho)

Passa a expressar LPG, aumenta gp63 (lipofosfoglicano, molécula majoritária)



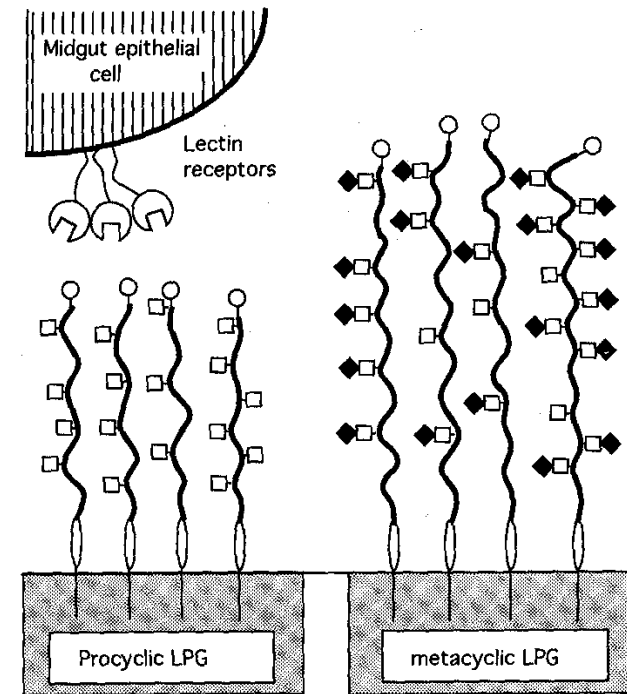
SOBREVIVÊNCIA NO VETOR

Metaciclogênese: vários estágios

LPG de promastigotas:

- Adesão do parasita ao intestino
- Muda na metaciclogênese- perda adesão

-Diferenças entre espécies-
competência vetorial
(compatibilidade)



SOBREVIVÊNCIA NO VETOR

Conclusão da metaciclogênese: saliva e sangue

Migração para região anterior: açúcar e outros

Inóculo: **regurgitação** do aglomerado de metacíclicos devido ao "promastigote secretory gel (PSG) plug"

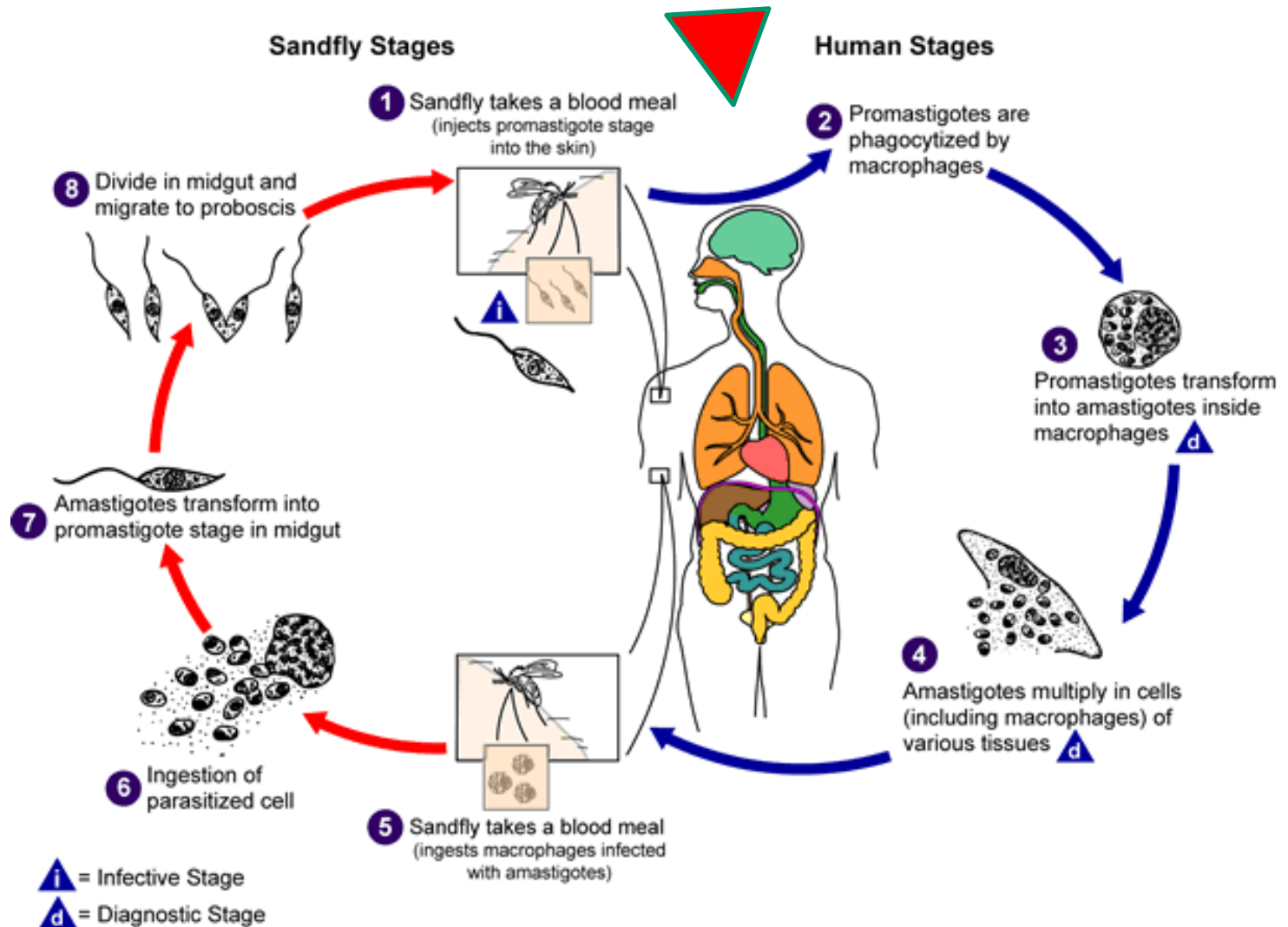
Saliva do vetor:

a. induz vasodilatação,

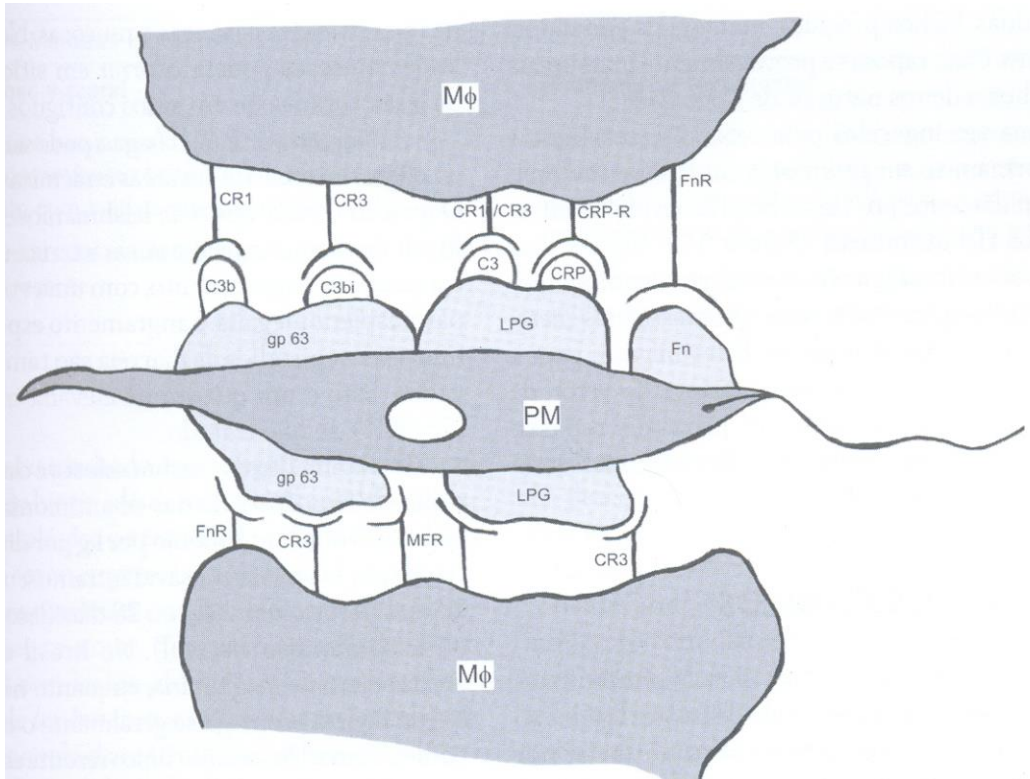
b. previne a coagulação,

c. tem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (inibe ativação de macrófagos)

CICLO



ADESÃO DE PROMASTIGOTA AO MACROFÁGO

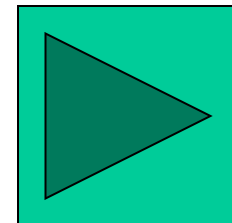


Fagocitose "facilitada"

gp63, LPG, PPG, "PS-like"

CR, FnR, MR, CRP, PS-R

Ferreira *et al*, 2003

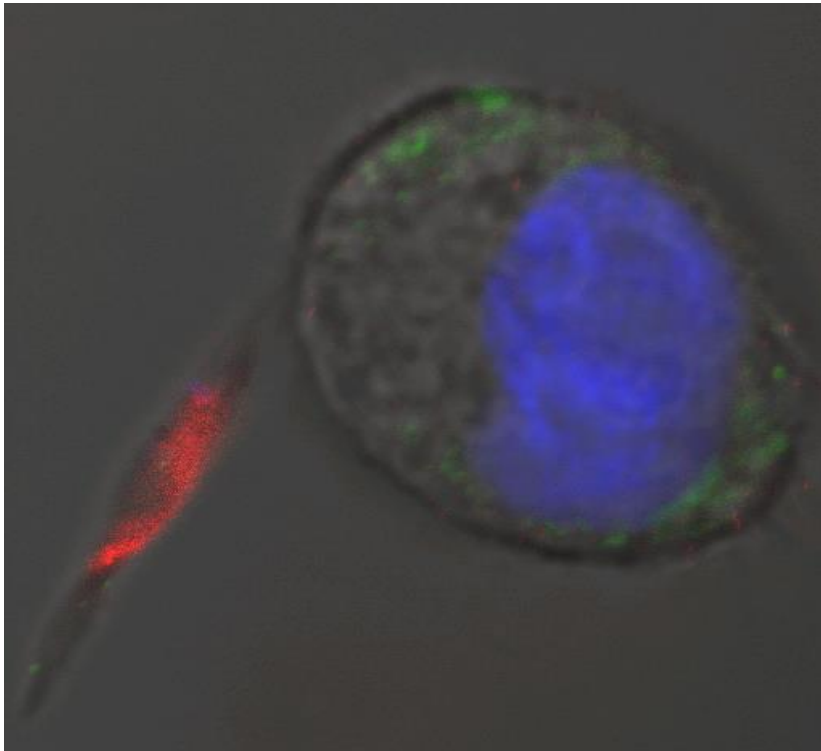


SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO

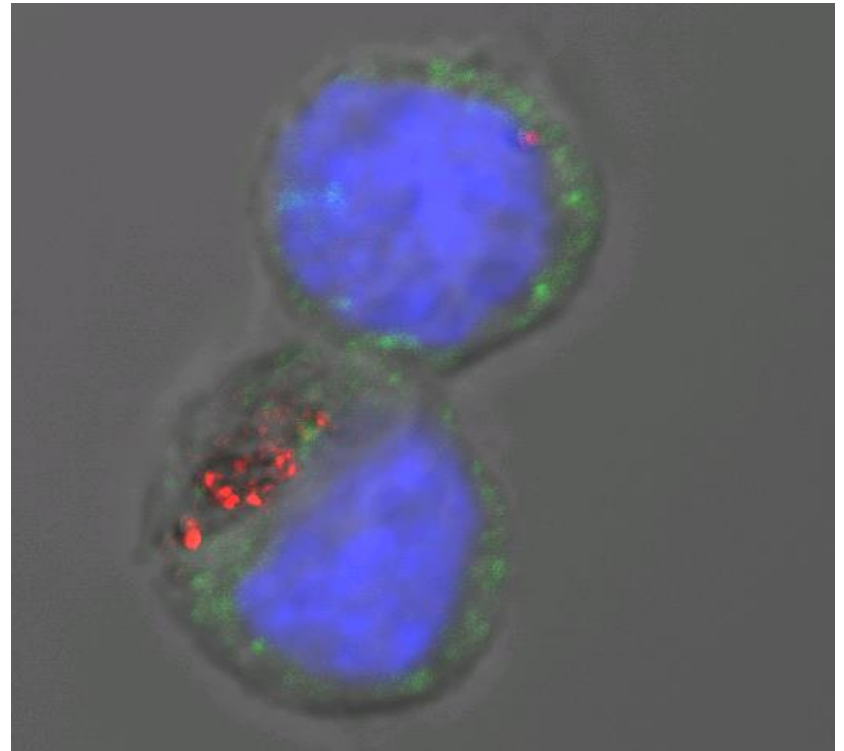
Após fagocitose (5 a 60min), promastigotas no vacúolo parasitóforo

Promastigotas → amastigotas

30min



4h



SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO

- gp63 (protease) inativa complemento: C3b-C3bi (ligam CR3)
Entrada via CR3 inibe "burst" oxidativo
- gp63 e LPG protegem o parasita de enzimas lisossomais
- Diminuição de MHC II na superfície do macrófago
- Usa IL-2 como fator de crescimento, reduz inflamação (IFN γ , IL1)
- LPG induz TGF β e IL10 e inibe produção NO
- Tem SOD: protege contra radicais superóxido

Mecanismos de evasão:

LPG inibe o burst oxidativo

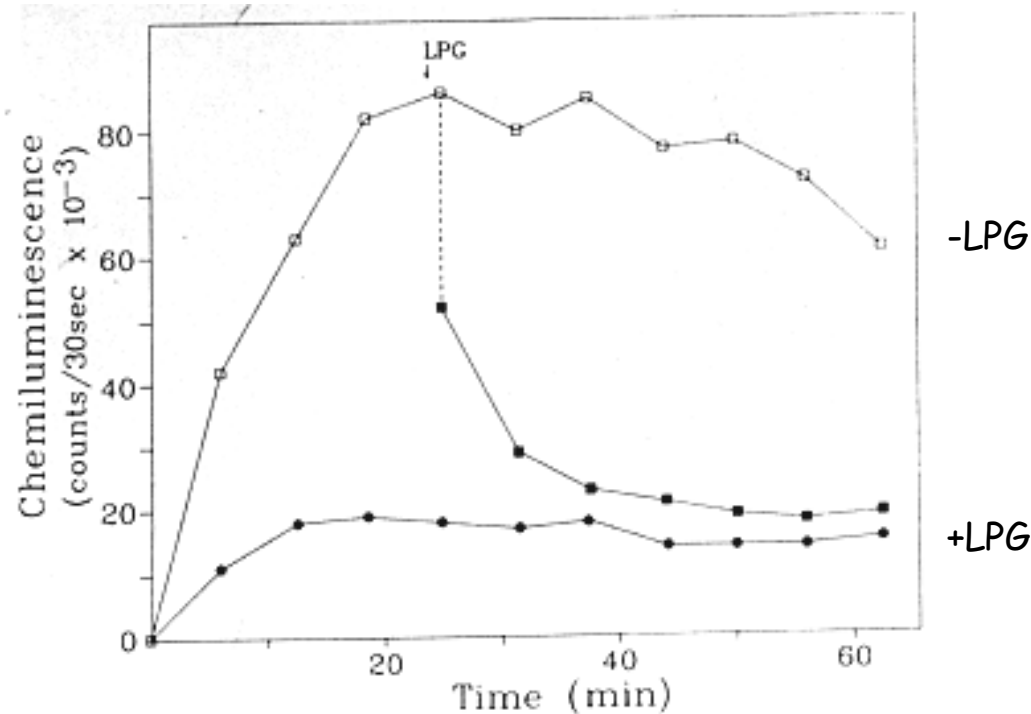
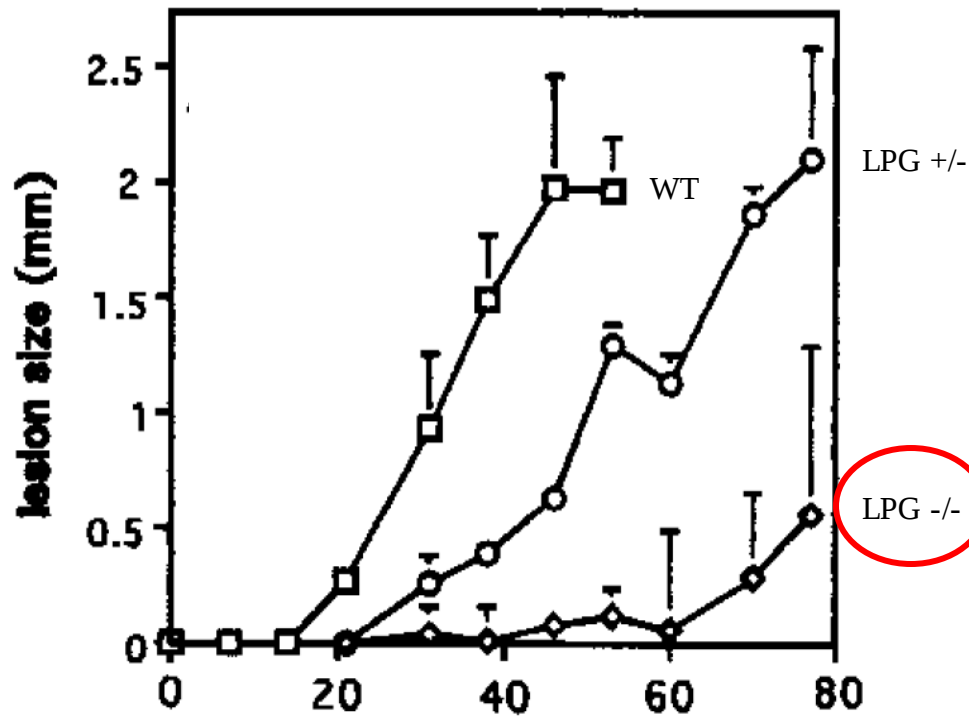


Figure 5. Attenuation of the oxidative burst in stimulated monocytes. Monocytes either in the presence (●—●) or absence (□—□) of LPG (100 μ M) were incubated for 10 min at 22°C and then stimulated by PMA (10 μ g/ml) and the oxidative burst measured. At the 20 min time point, LPG (100 μ M) was added to one set of monocytes (■—■) and an immediate drop in chemiluminescence was observed. Values plotted are the mean of duplicate values for a typical data set.

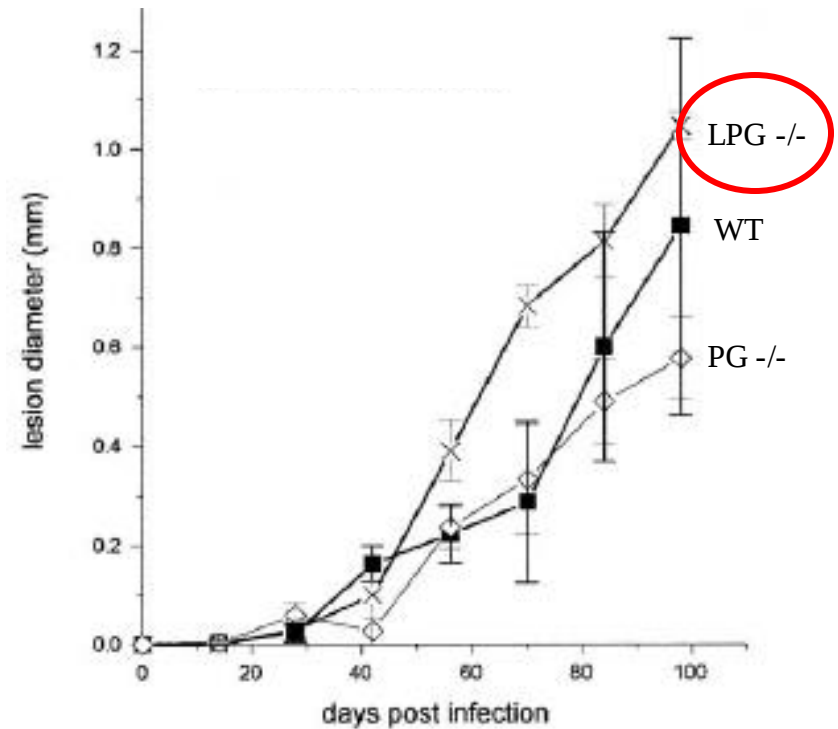
LPG é fator de virulência em algumas mas não todas spp de *Leishmania*

L. major



Spath et al., 2000

L. mexicana



Ilg et al., 2001

Mecanismos de escape do Sistema Imune

Fagocitose silenciosa via receptor de complemento
gp63 inativa complemento

Redução MHC II no macrófago

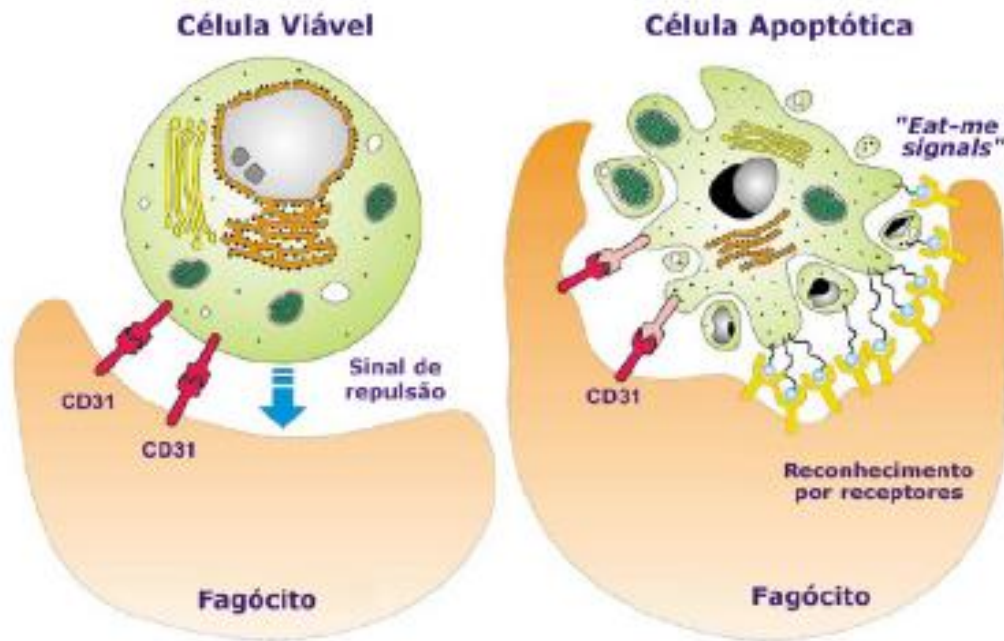
Uso de IL2, redução de IL1 e IFN γ

Leishmaniose **visceral**: imunossupressão- aumento IL10
e TGF β , redução IL12 e IFN γ

Apoptose e mimetismo apoptótico

Fagocitose por neutrófilos

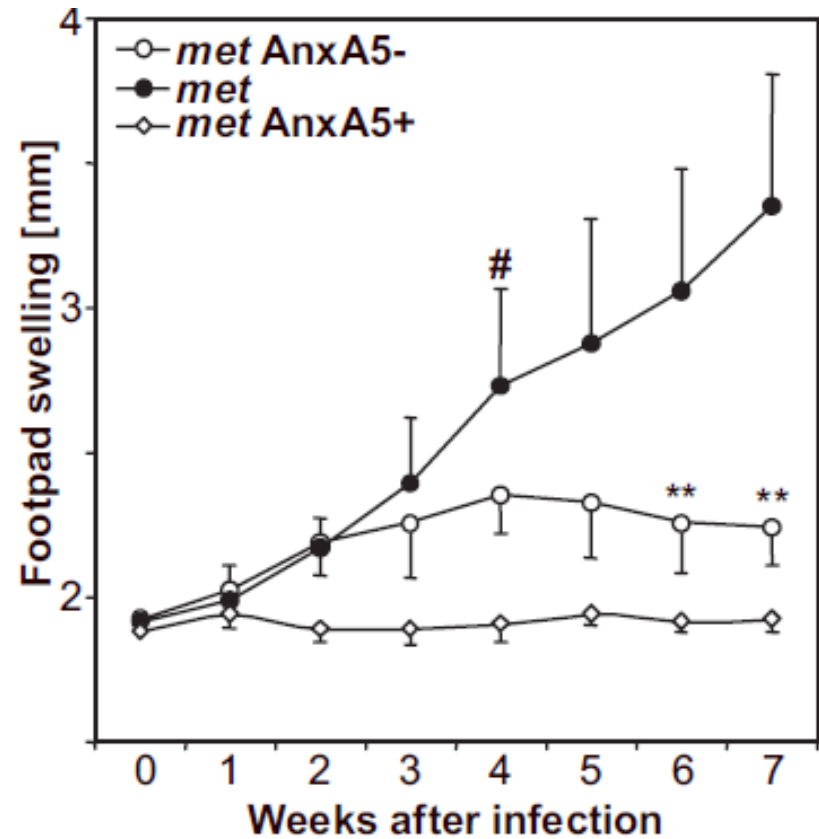
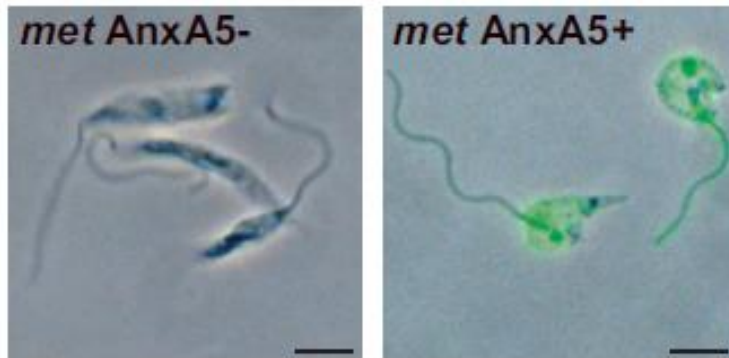
"Apoptose" (promastigotas)



Modificado de Lauber *et al.*, 2004

Deolindo, 2008

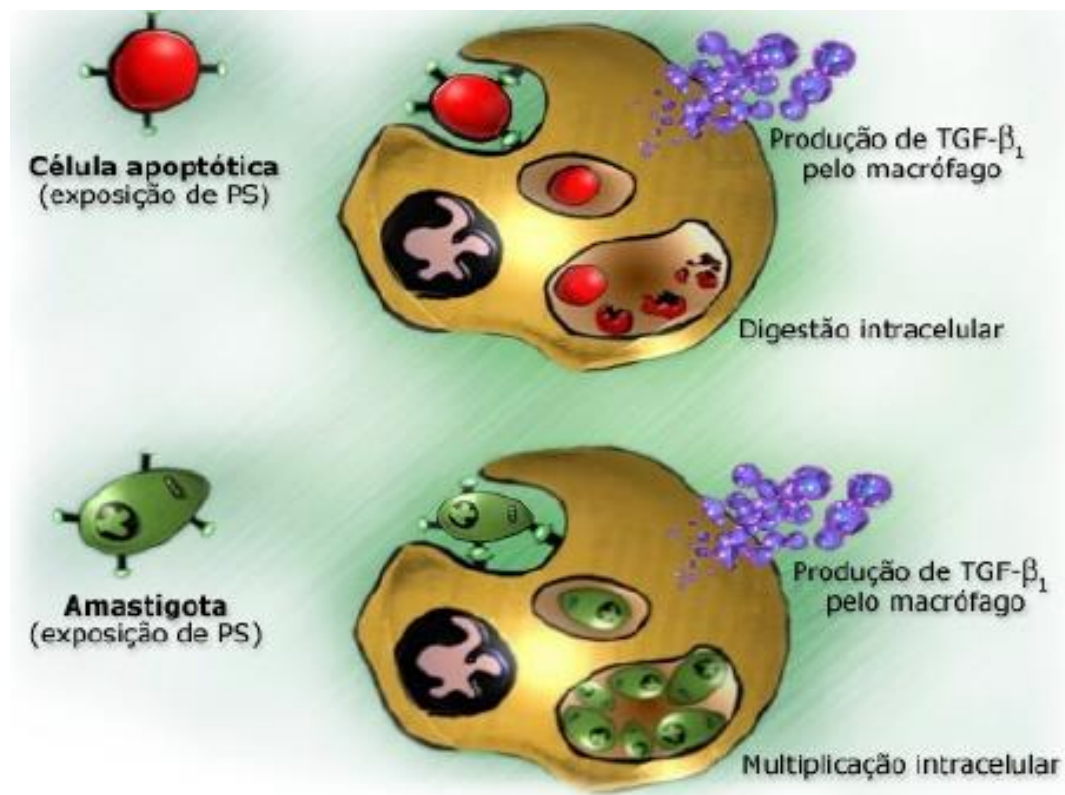
"Apoptose" (promastigotas)



Van Zandbergen et al., 2006

Promastigotas apoptóticos "altruístas" induzem TGF β e inativam macrófago

“Mimetismo Apoptótico” (amastigotas)



Deolindo, 2008

Amastigotas expõem “PS” mas não morrem

Neutrófilos e *Leishmania*: Cavalo de Tróia?

Cavalo= presente de Odisseu para selar a paz



→ gregos

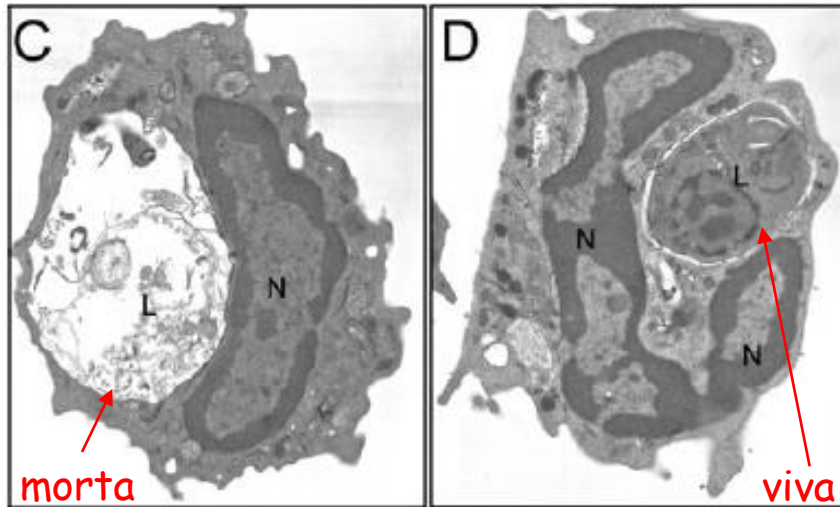
Troia, 1200-1300 a.C. (10 anos)

Neutrófilos e *Leishmania*: Cavalo de Tróia?

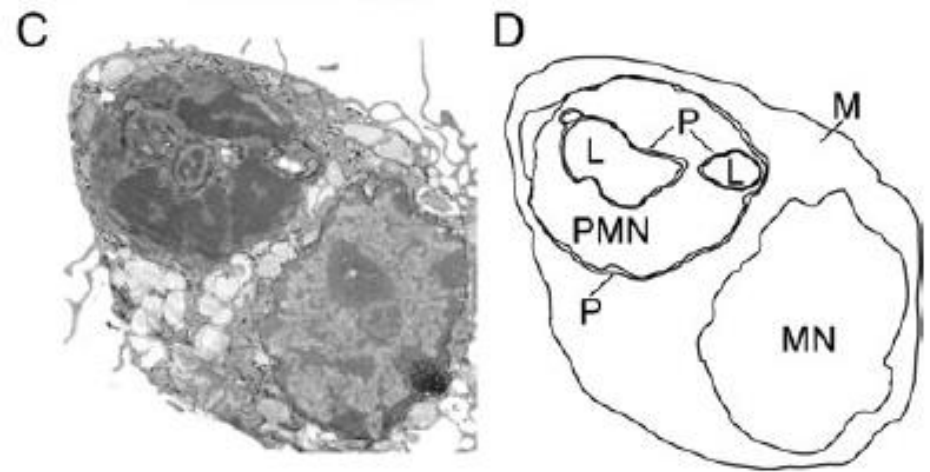
Rápido recrutamento de neutrófilos após inoculação (30min)

LPG inibe lise em alguns neutrófilos

Neutrófilos em apoptose (horas) são fagocitados por macrófagos



Leishmania donovani em neutrófilos



Macrófago fagocita neutrófilos com *L. donovani*

Gueirard et al., 2008

Importância na infecção? Em quais spp?

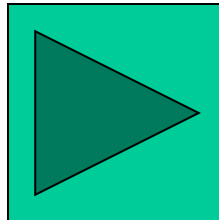
In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies

Nathan C. Peters,^{1*} Jackson G. Egen,^{2*†} Nagila Secundino,¹ Alain Debrabant,³ Nicola Kimblin,¹ Shaden Kamhawi,¹ Phillip Lawyer,¹ Michael P. Fay,⁴ Ronald N. Germain,^{2‡} David Sacks^{1†‡}

Science, ago 2008

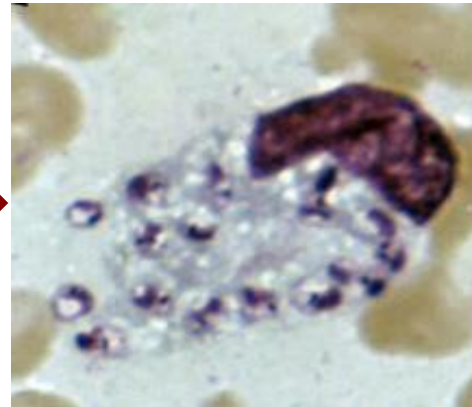
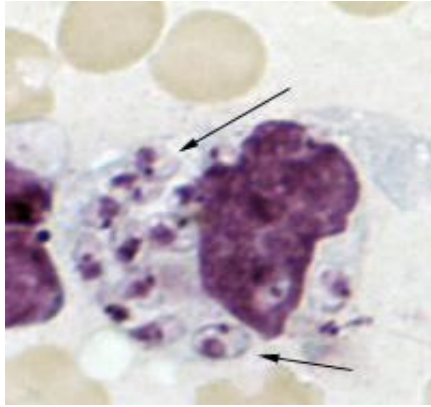
Neutrófilos (verdes) migram dos vasos (azuis) para local do inóculo de *L. major* (vermelha)

(filmagem iniciada 30min após infecção, acelerada 600x)



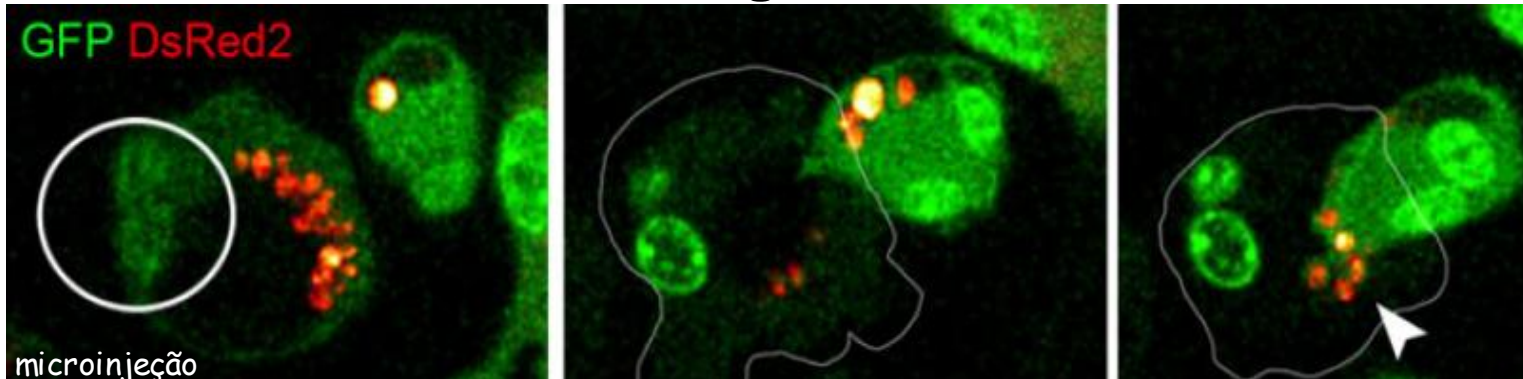
SAÍDA DE AMASTIGOTAS DOS MACRÓFAGOS

Rompimento do macrófago



CDC

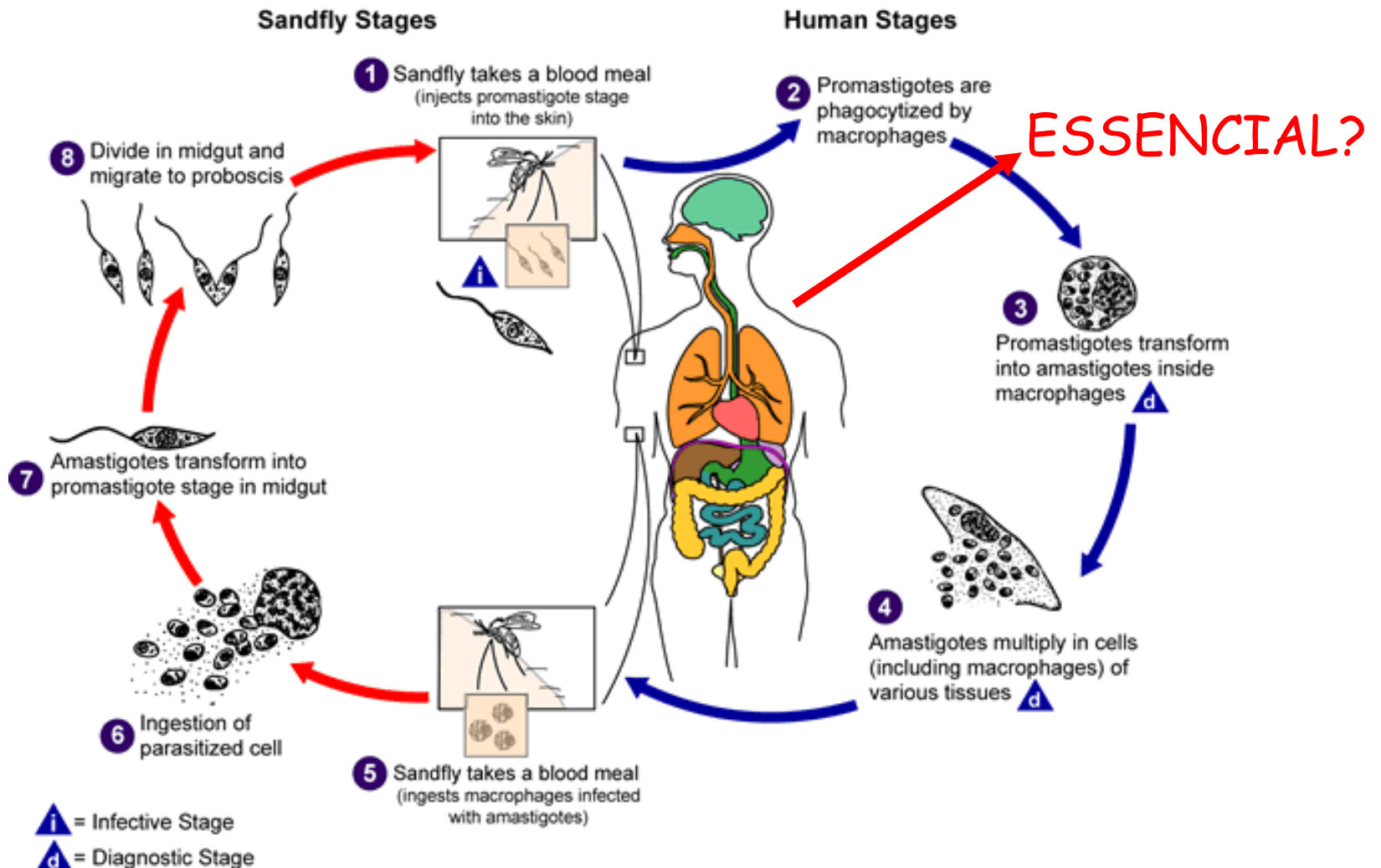
Transferência entre macrófagos



Real et al., 2014

Amastigotas tem pouca gp63, algumas espécies não tem LPG
Moléculas diferentes para adesão (PPG?)

CICLO



RESERVATÓRIOS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Dependem do microambiente do vetor e da espécie de *Leishmania*

Tegumentares (cutâneas e mucocutâneas): roedores silvestres, cães, equinos



No Brasil:

L.braziliensis: cotias, pacas, roedores silvestres, ratos, cães

L.amazonensis: marsupiais, pequenos roedores

RESERVATÓRIOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL

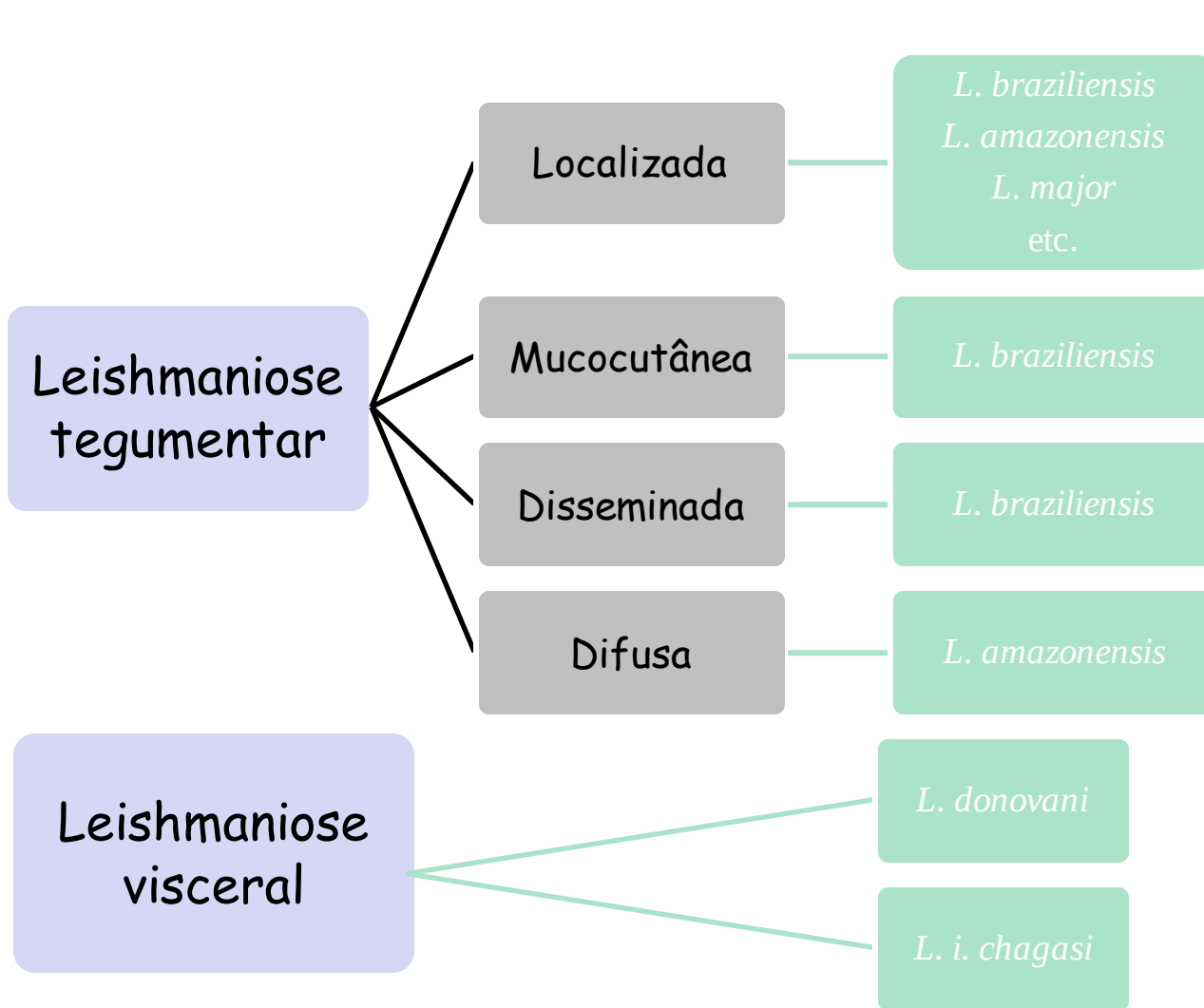
Visceral: canídeos (doença variável, 50% assintomáticos)
Muitos amastigotas em macrófagos da pele: importante para transmissão

No Brasil:

L. chagasi: cães, raposas e provavelmente marsupiais



LEISHMANIOSE-Síndromes clínicas



Quadro clínico- forma cutânea localizada

L. (V.) braziliensis
L. (L.) amazonensis
L. (V.) guyanensis



2-8 sem após infecção

Lesões únicas ou limitadas, úlceras com bordas elevadas

Quadro clínico- forma cutânea difusa

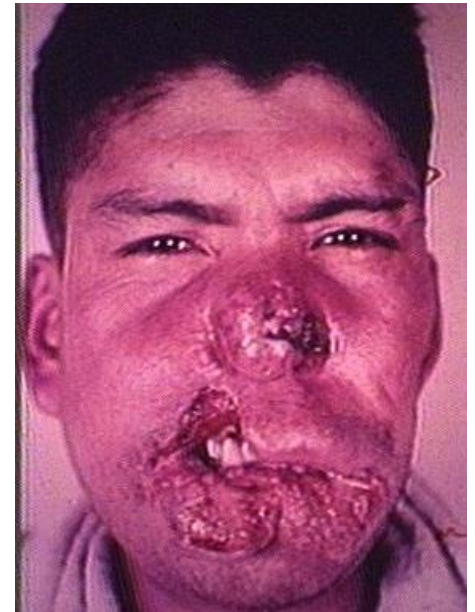
L. (L.) amazonensis



- Anergia da resposta imune-
paciente não responde à
Leishmania (RID -)
- Múltiplas lesões nodulares
disseminadas
- Difícil tratamento
- Rara (5% dos pacientes com
L. amazonensis)

Quadro clínico- forma mucosa

L. (V.) braziliensis



- Doença crônica
- Morbidade e estigma social
- Tratamento prolongado e tóxico.



Figura pré-colombiana (séc I AC)
mostrando os efeitos do "huaco"



Quadro clínico-forma visceral (calazar)

L. (L.) chagasi

No Brasil crianças são grupo de risco

Infecção sistema FM baço, fígado, tecidos linfóides e medula óssea

Febre irregular, perda de peso, aumento de baço e fígado e anemia. Pele cinza (Índia)= calazar (febre negra)

- Período de incubação: 2 a 6 meses
- Assintomáticos em proporções variáveis



Importância da Resposta imune

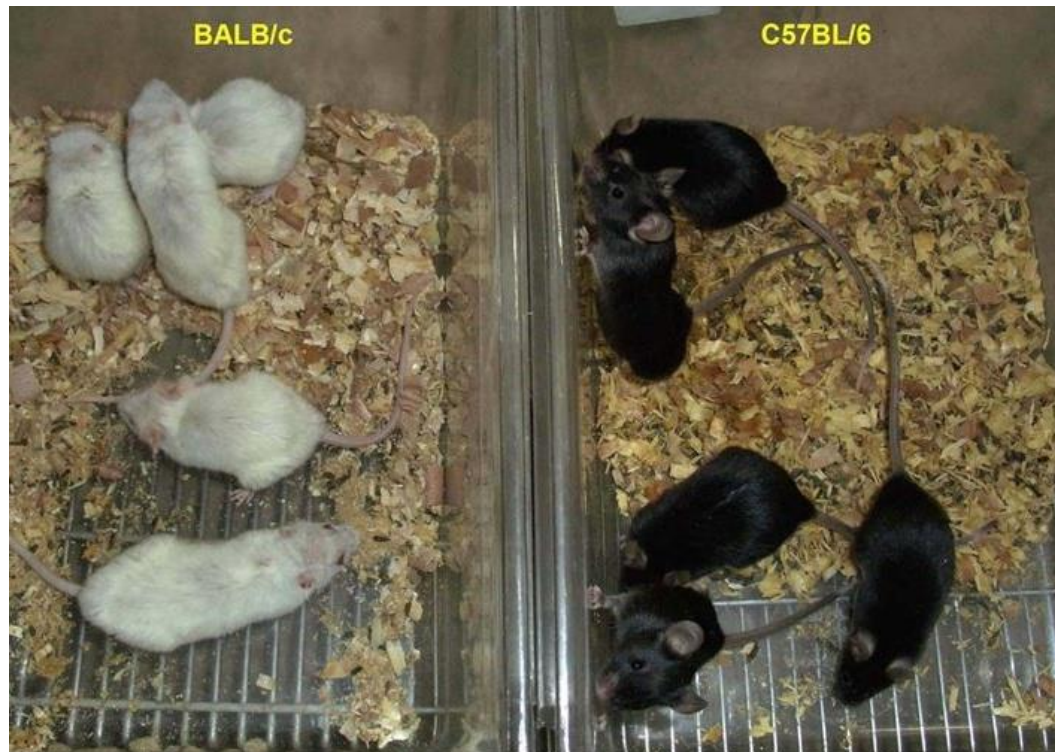
RECIPROCAL EXPRESSION OF INTERFERON γ OR INTERLEUKIN 4 DURING THE RESOLUTION OR PROGRESSION OF MURINE LEISHMANIASIS

Evidence for Expansion of Distinct Helper T Cell Subsets

By FREDERICK P. HEINZEL,* MICHAEL D. SADICK,* BETTIE J. HOLADAY,*
ROBERT L. COFFMAN,† AND RICHARD M. LOCKSLEY*

J. EXP. MED. © The Rockefeller University Press
Volume 169 January 1989 59-72

Leishmania major



Importância da Resposta imune

Leishmania major

Macrófago infectado

Ativação do "burst respiratório" e produção de NO

Apresentação de antígenos na superfície

Respostas

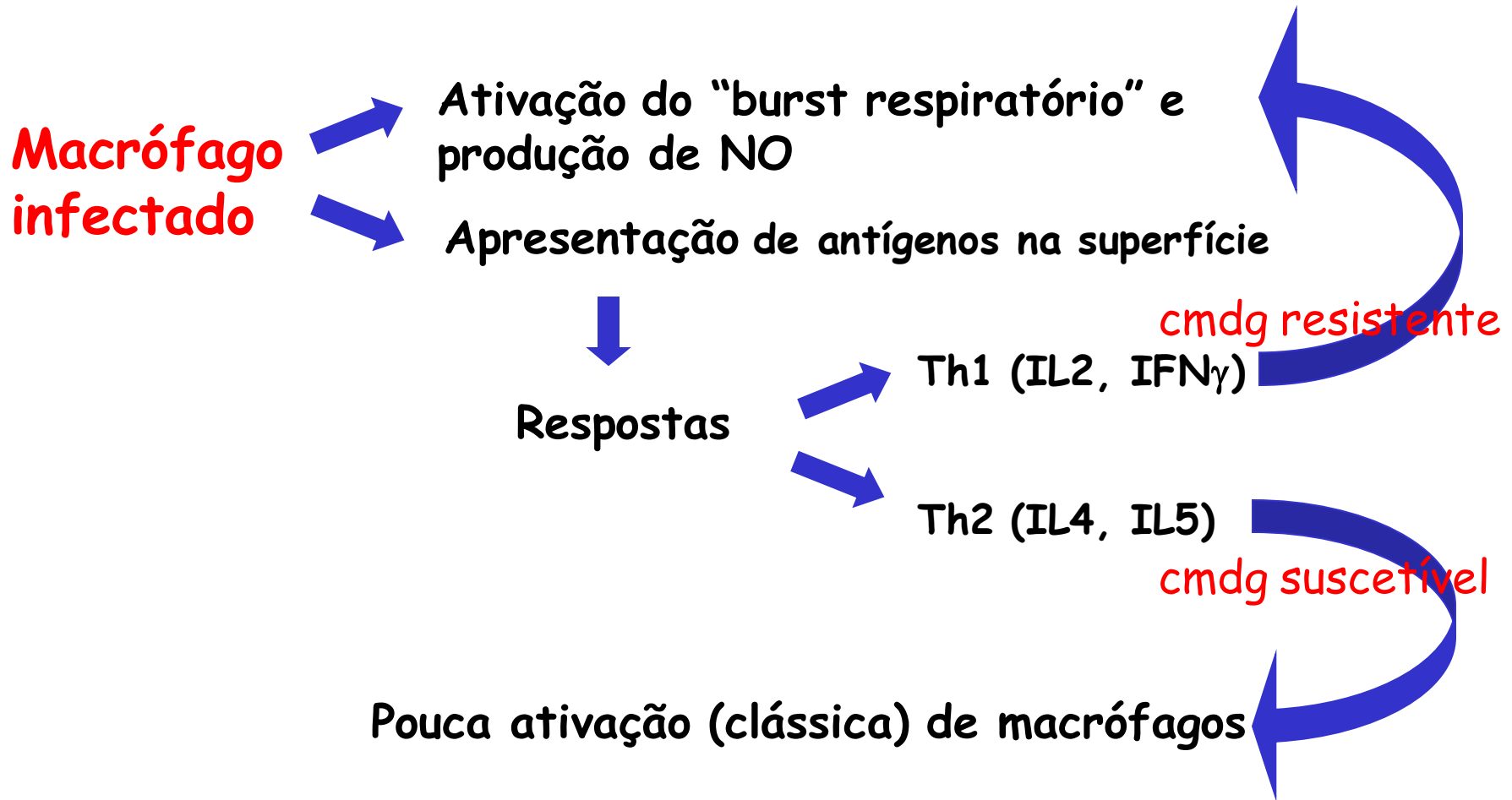
Th1 (IL2, IFN γ)

Th2 (IL4, IL5)

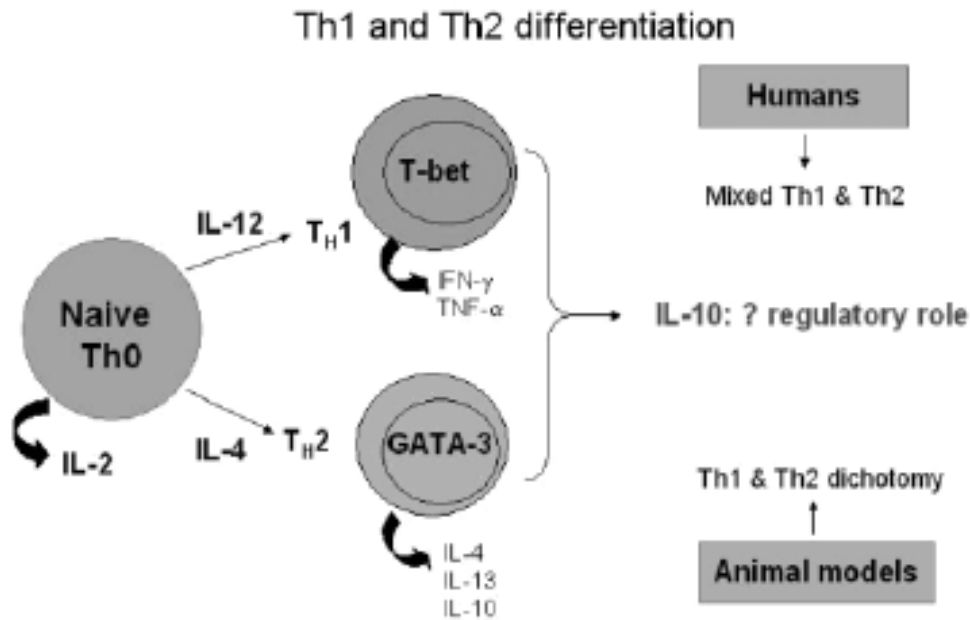
cmdg resistente

cmdg suscetível

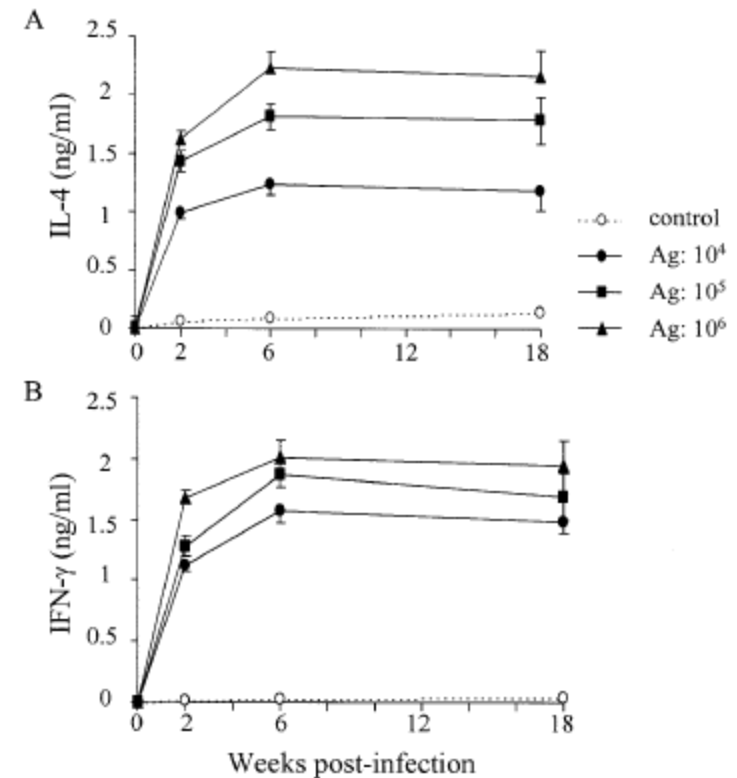
Pouca ativação (clássica) de macrófagos



Homem $\neq$ camundongo, *L. amazonensis* $\neq$ *L. major*



L. amazonensis em
BALB/C: mixed Th1/Th2 response



DIAGNÓSTICO

1 - Parasitológico

LT- raspado/biópsia da lesão

LV- aspirado de medula óssea/baço/fígado

Pesquisa direta: imprint, esfregaço, histopatológico
Cultura

DIAGNÓSTICO

2- Imunodiagnóstico: pesquisa de anticorpos específicos contra o parasita

- Teste imunocromatográfico (teste rápido IT-Leish®)
- Imunofluorescência, ELISA
- Imunohistoquímica
- Reação intradérmica= Resposta celular após 48h (hipersensibilidade tardia) Teste de Montenegro (1926)
- Aglutinação direta

Teste imunocromatográfico (teste rápido IT-Leish®) (baseado no antígeno k39)



sensibilidade 93%
especificidade 97%



TRATAMENTO

1. Antimoniais pentavalentes (Gaspar Vianna, 1913)

-Intravenosos ou intramusculares, tóxicos, hospitalização

-20 dias (cutânea) ou 28 dias (mucosa ou visceral)

Bloqueiam quinases da glicólise + outros mecanismos

Frequente resistência na Índia, alguma em outros países

2. Anfotericina B: intravenosa, tóxica, hospitalização

- Liposomal (AmBisome®): melhor mas muito cara

-Interage com ergosterol da membrana do parasita, tornando-a permeável

Pouca resistência

3. Pentamidina:

- Intravenosa, tóxica
 - Altera a estrutura do cinetoplasto e síntese de DNA, RNA, fosfolípidios e proteínas
- Resistência na Índia

Miltefosina: primeira droga oral
Teratogênica (proibida para gestantes). Desde 2002
Bom na Índia, variável nas Américas. Resistência

Tratamento local com drogas ou aquecimento para espécies mais "brandas" (velho mundo)

Tratamentos disponíveis:

Difícil administração, longo, tóxico, caro, resistência

≠

Tratamento ideal:

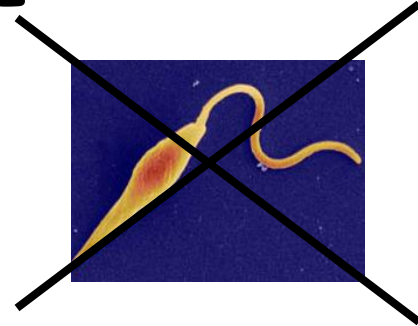
oral, seguro, eficaz, baixo custo, curta duração (~10 dias)

PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO?

Índia: 50% dos casos do mundo; Bihar: 90% dos casos indianos



PERSPECTIVAS DE CONTROLE



1-Vetor? Doméstico x Silvestre

Índia: hábitos domésticos (DDT eficaz 1950)

2-Reservatório? Doméstico x Silvestre

Tratamento de cães- Problemas: diagnóstico, reinfecção e sacrifício

Animais silvestres???

3-Mudança de hábitos/habitações, reduzir desmatamento

VACINAS

Imunidade protetora após infecção - "leishmanização"
Vacinação com parasitas de lesão/mortos/atenuados confere considerável proteção

Antígenos relativamente conservados entre espécies (vacinas de combinações de proteínas, DNA, etc)- resultados pouco animadores

Moléculas da saliva do vetor: proteção para algumas spp de *Leishmania* em algumas spp de camundongo

Vacinação camundongos BALB/C com *L. talentolae* (lagartos) induziu Th1 e proteção

VACINAS EM CÃES



Particular:

Leish-Tec® = Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina

Animais soronegativos, preventiva

No mercado desde 2007, única disponível no momento, 96% eficácia

Associar com controle por uso de coleiras impregnadas com deltametrina e hábitos preventivos

NEGLIGENCIADOS!



Kabul- rejeição