

LEISHMANIOSES



Porque estudar leishmaniose?

Grande endemia: 88 países

12 milhões infectadas (2mi/ano)

350 milhões de pessoas ameaçadas de infecção

Alta incidência no Brasil

Deprime sistema imunológico- associação com HIV

✓ Enfoque desta aula:

- Agente etiológico
- Epidemiologia
- Ciclo de vida
- Transmissão - Vetor
- Patogenia
- Diagnóstico
- Tratamento
- Controle

Tripanossomatídeos parasitas

Ordem **Kinetoplastida**

Família **Trypanosomatidae**

Gêneros ***Leishmania***

Trypanosoma - *T. cruzi* - Doença de Chagas

T. brucei- Doença do Sono

Phytomonas - parasitas de plantas

Leishmania

Gênero *Leishmania*

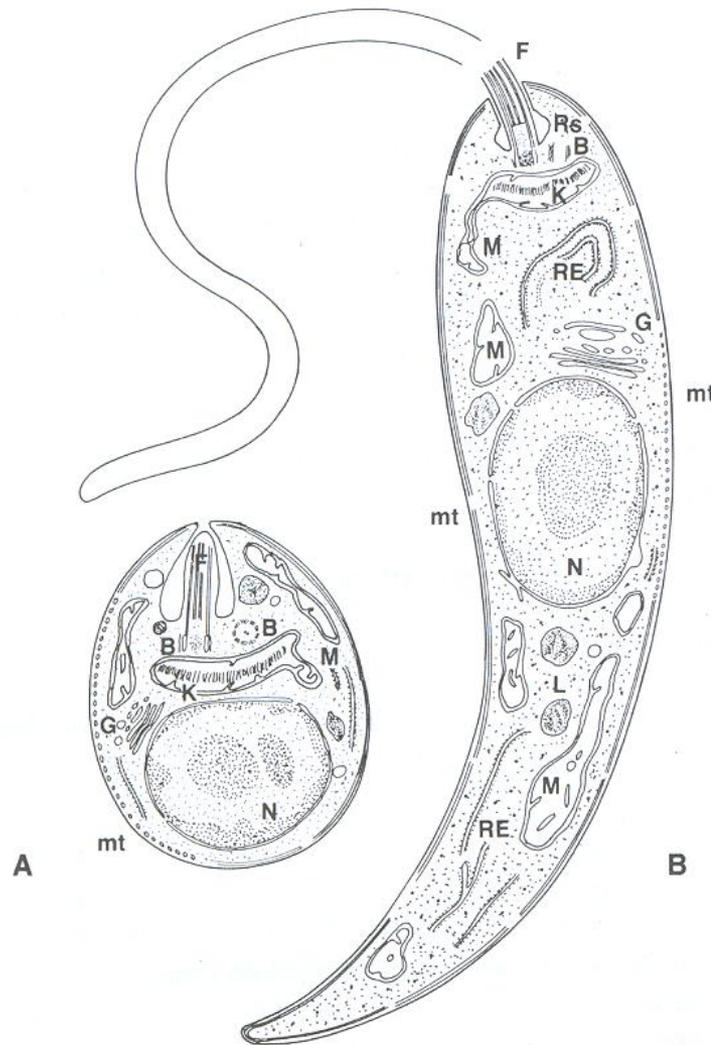
Sub-gêneros *Leishmania*
Viannia

20 espécies patogênicas homem



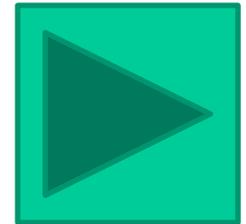
FORMAS DO PARASITA

Amastigota
Intracelular
(anaeróbico)
(2-6um)



Promastigota
Vetor, cultura
(aeróbico)
(14-20um)

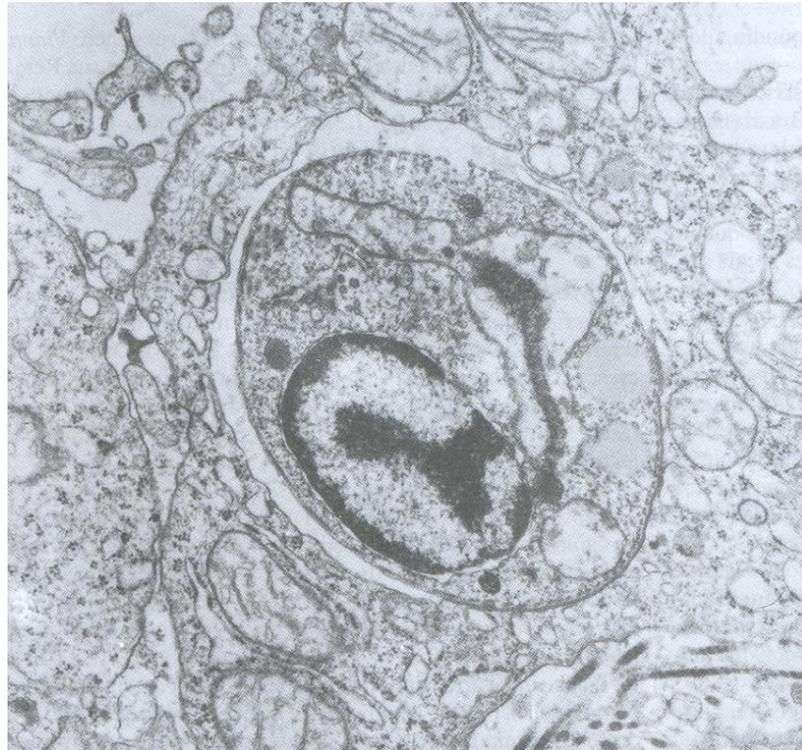
Promastigota



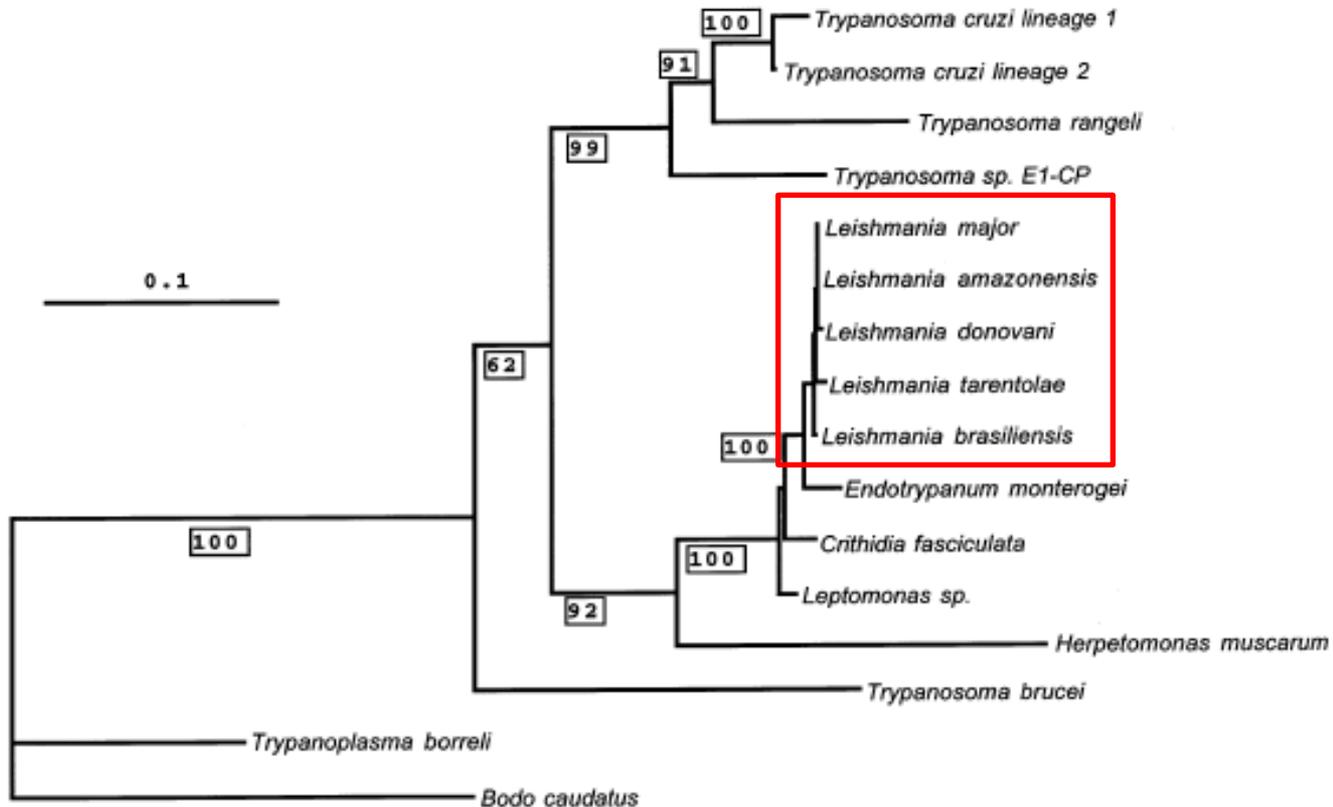
Reprodução por fissão binária no inseto vetor
Forma invasiva: promastigota metacíclico

Amastigota

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



FILOGENIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS



Árvore baseada em gene de rDNA

Ancestral de tripanosomatídeos: parasita de insetos

ESPÉCIES DO GÊNERO LEISHMANIA

Evolução clonal- spp separadas 15–50 milhões de anos,
1% genes espécie-específicos

Espécies morfológicamente semelhantes (exceções)

Transmitidos por diferentes vetores

Infectam diferentes hospedeiros vertebrados

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

Identificação por métodos moleculares

Espécies e Formas clínicas

Leishmaniose cutânea- *L. V. braziliensis*,
L. L. amazonensis,
L. V. guyanensis
L. L. major

Leishmaniose difusa - *L. L. amazonensis*

Leishmaniose mucosa - *L. V. braziliensis*

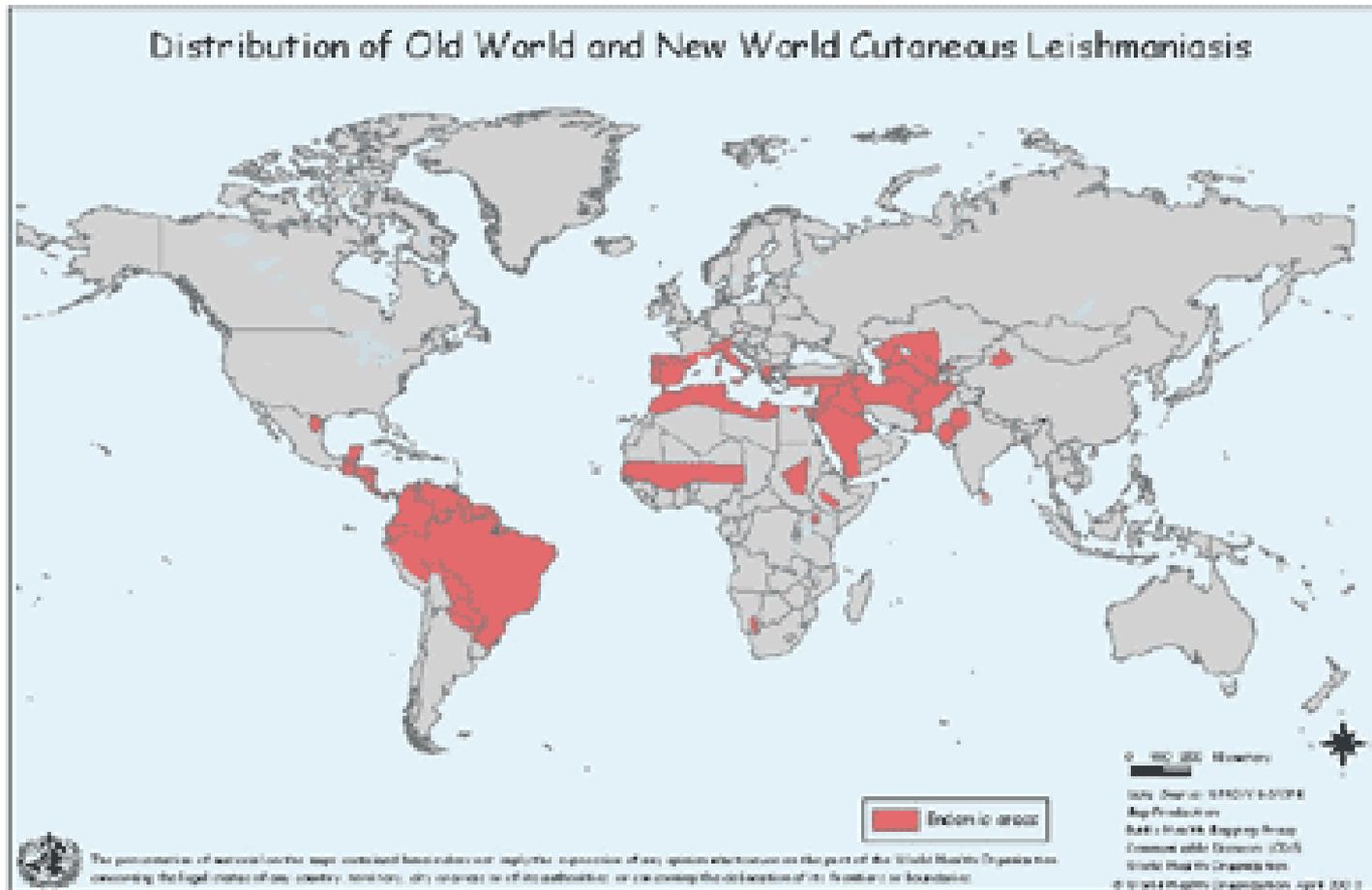
Leishmaniose visceral - *L. L. chagasi*, *L. L. donovani*



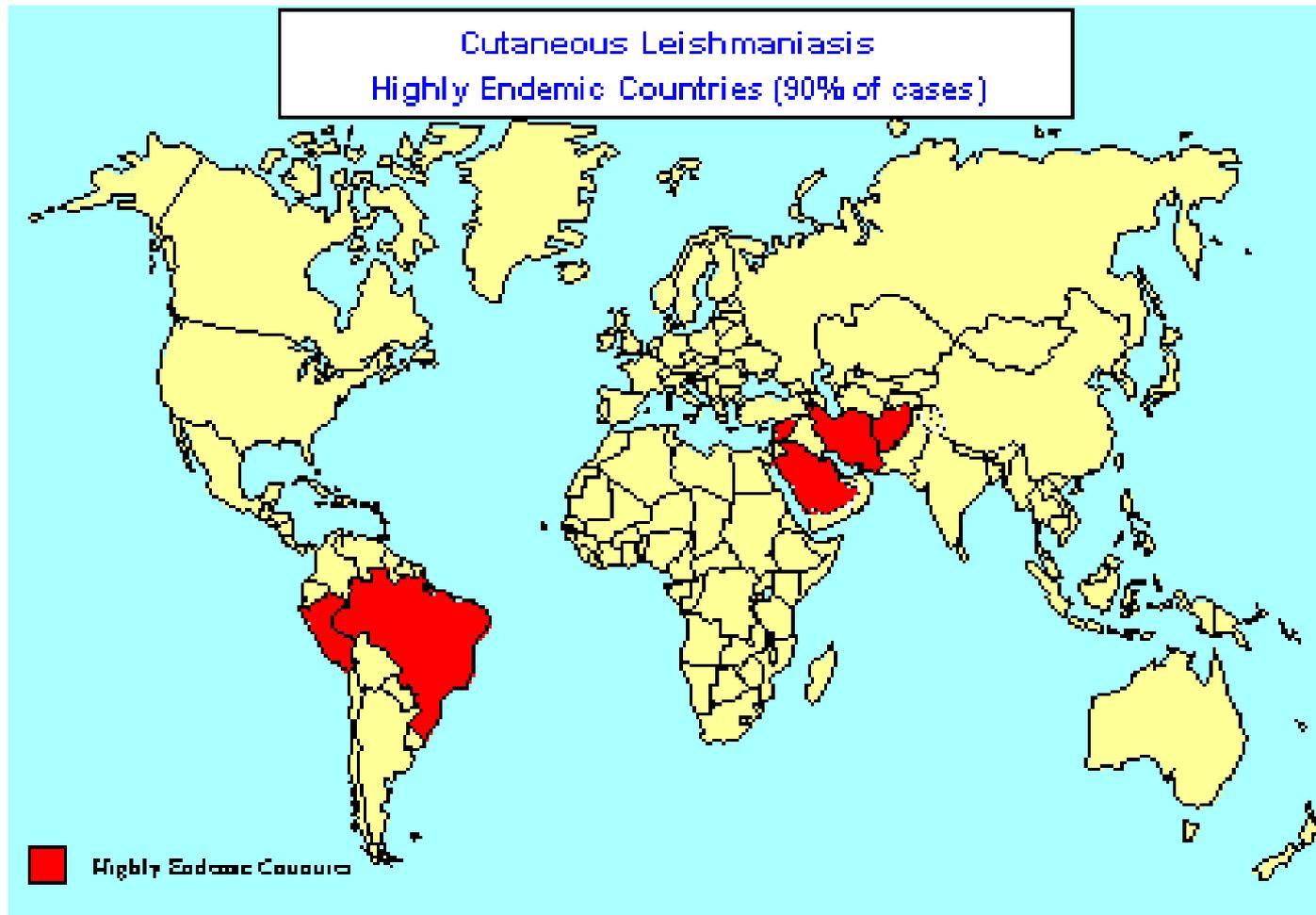
Novo Mundo

Velho Mundo

Distribuição Geográfica da Leishmaniose Cutânea (Tegumentar)



1,5 milhão de casos novos por ano



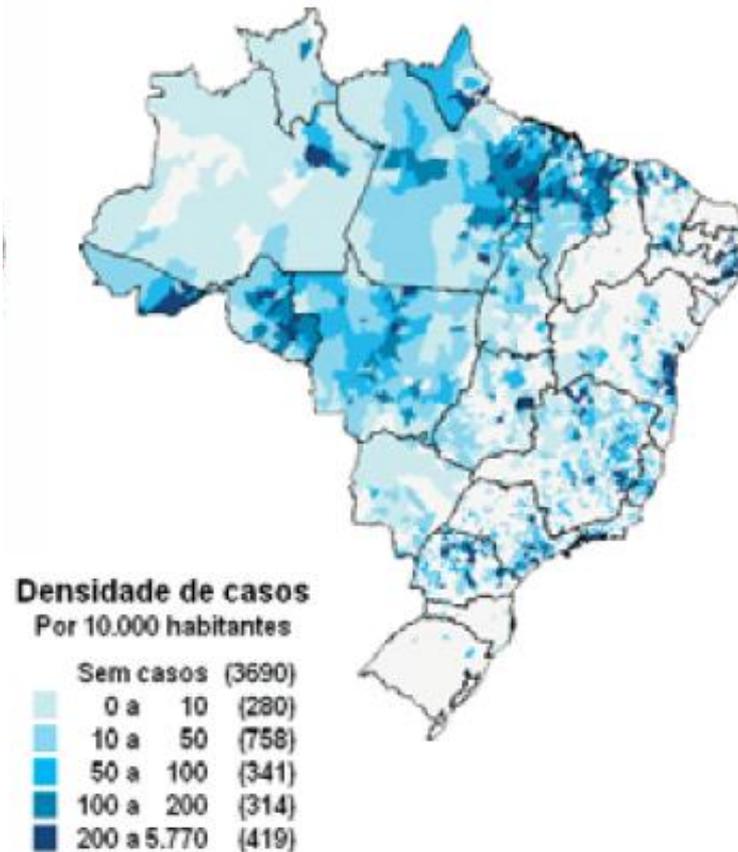
90% cutâneas: Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria

90% mucosas: Bolívia, Brasil, Peru

1300-2500 soldados americanos com LC após Afeganistão e Iraque (AMSA)

Leishmaniose Tegumentar no Brasil

2004



Sinan/ SVS-MS

Doença de ampla distribuição no território nacional (N, NE, CO, SE)

Tegumentar= cutânea, cutânea difusa e mucosa

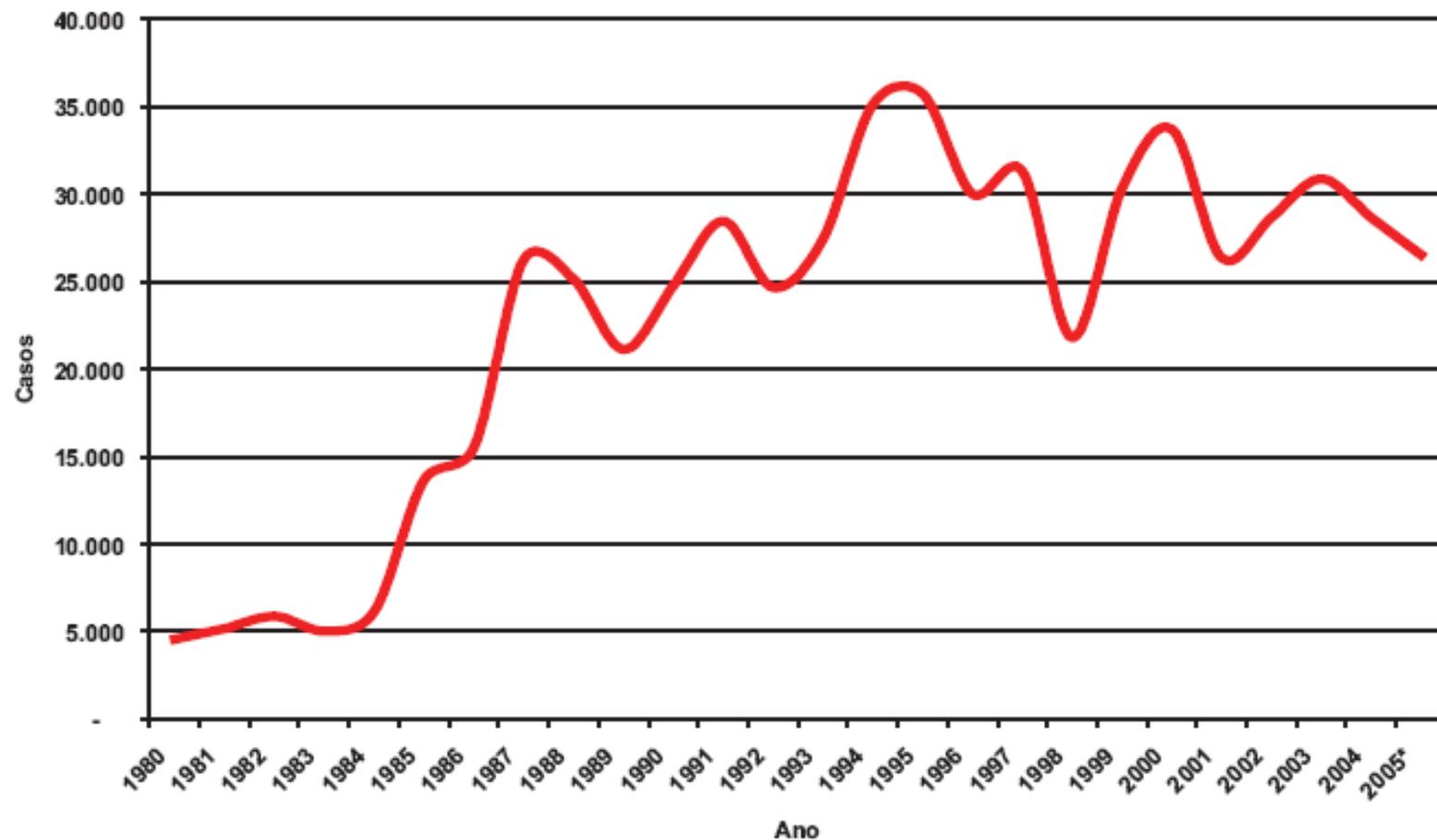
Figura 8 – Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005.



Fonte: SVS/MS

Principais agentes: *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*

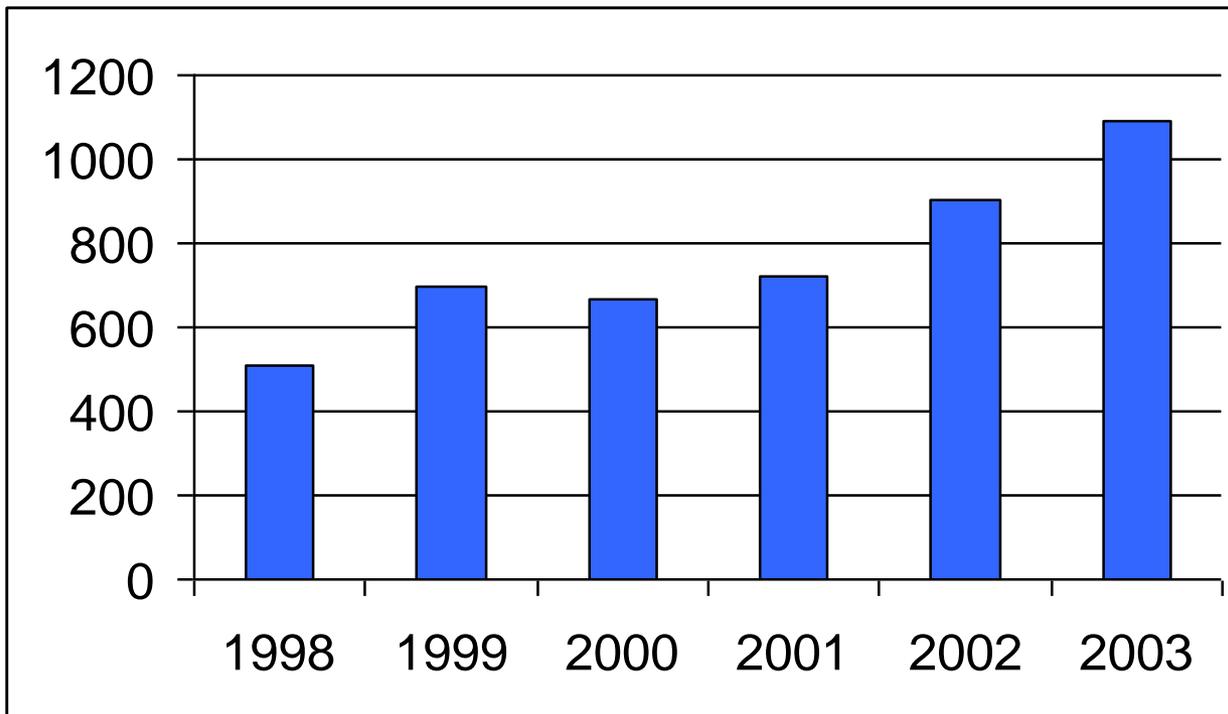
Figura 1 – Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2005.



Fonte: SVS/MS

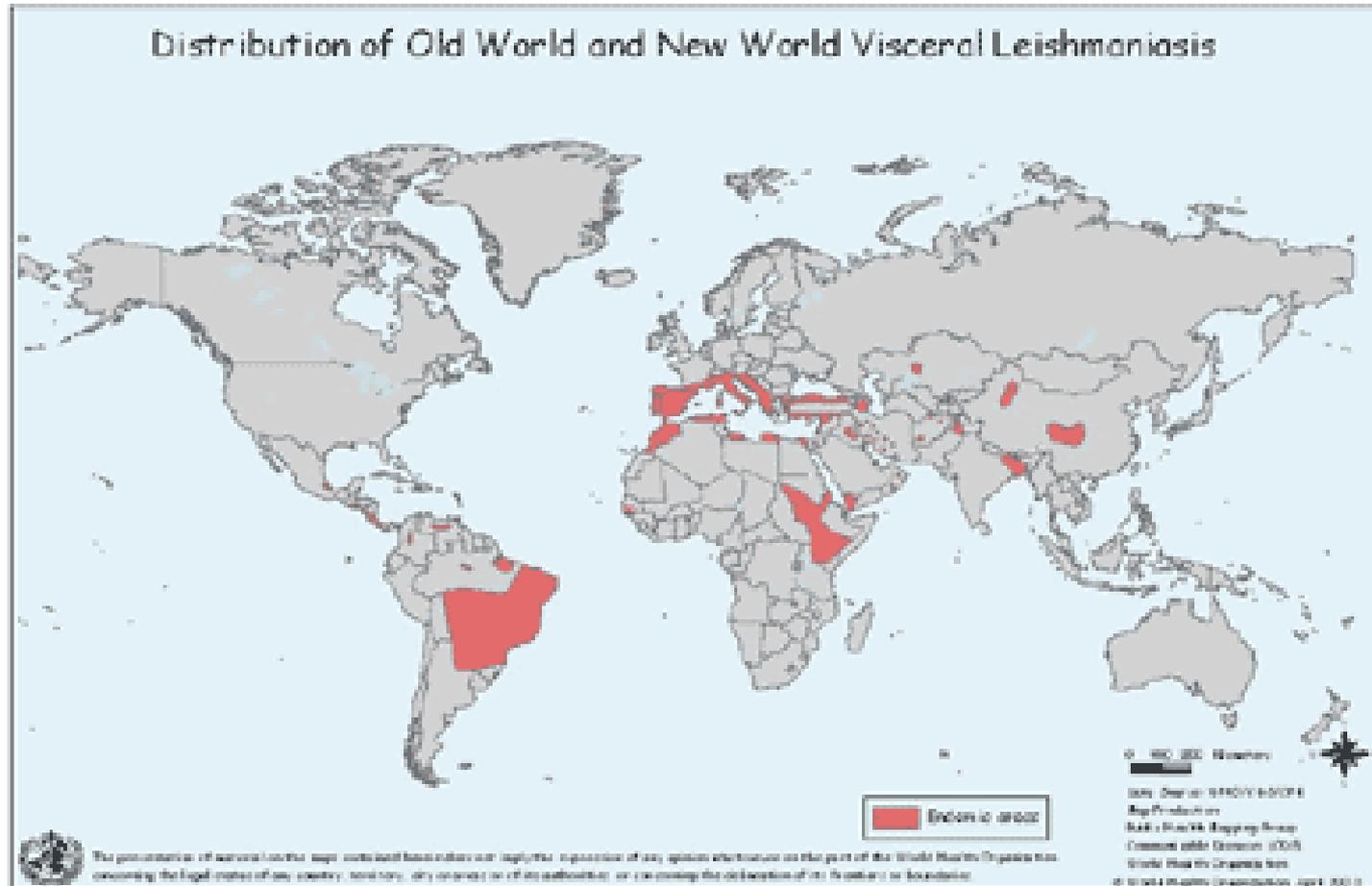
28.000 casos/ano (Ferreira, 2003)

Leishmaniose cutânea - Estado de SP

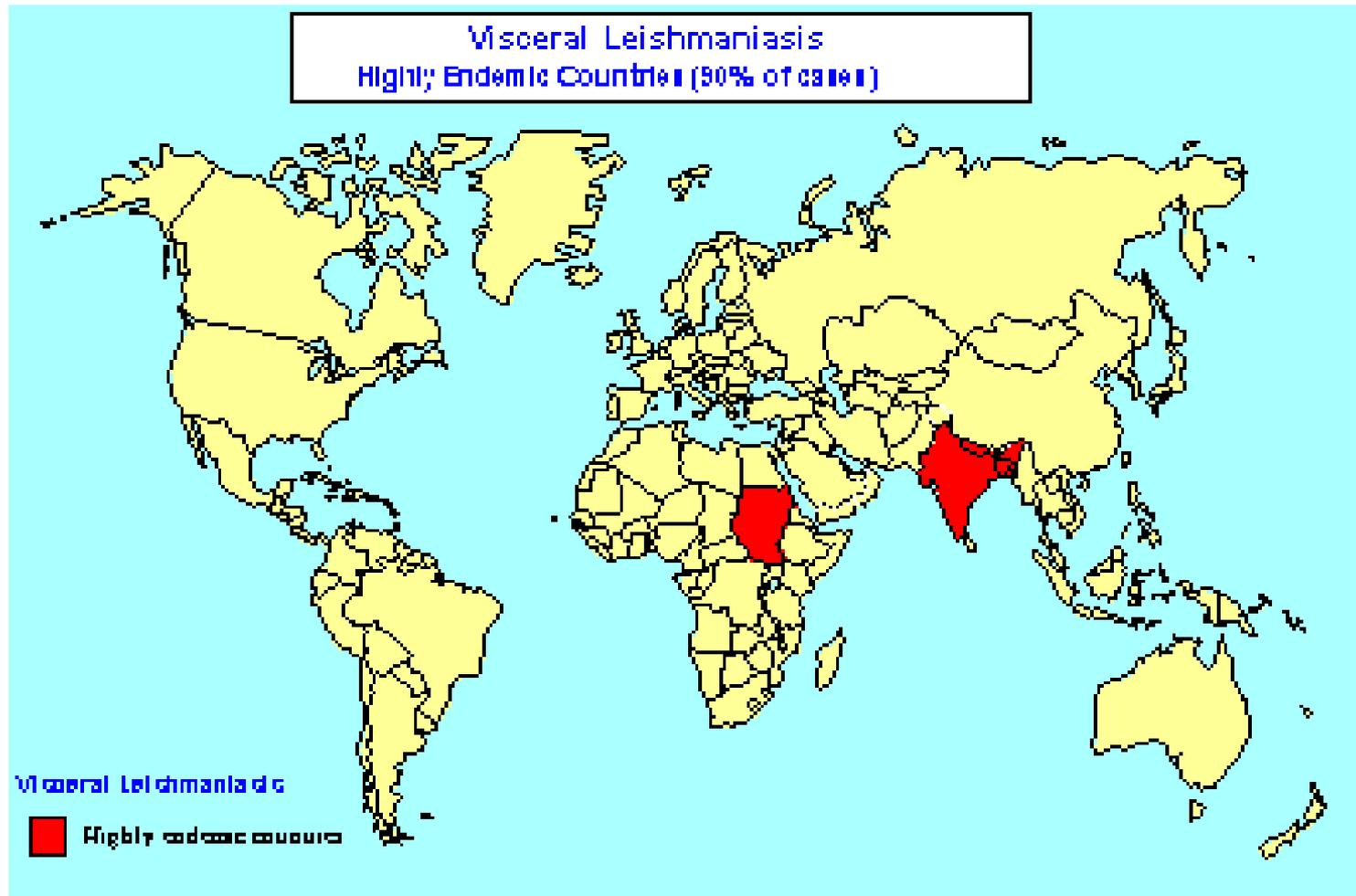


SUCEM

Distribuição Geográfica da Leishmaniose Visceral



500.000 casos novos por ano

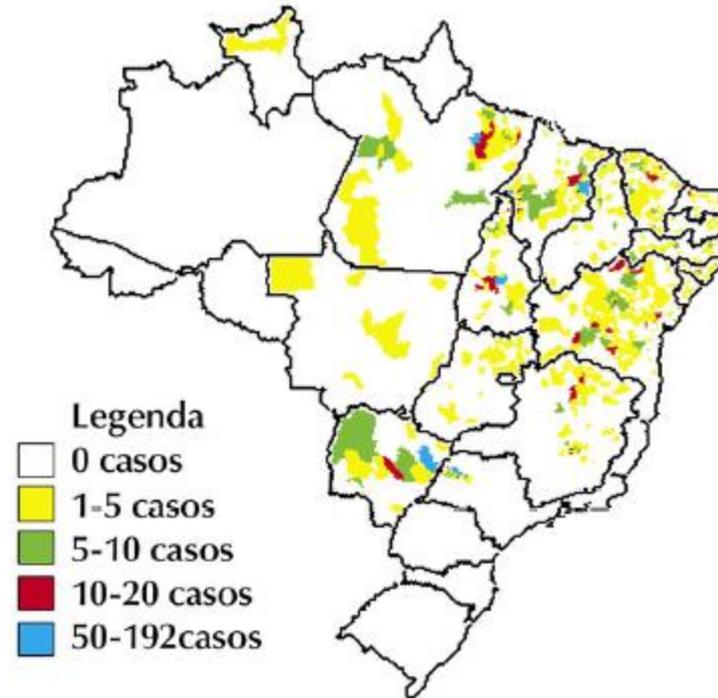


90% viscerais: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão

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

Leishmaniose Visceral no Brasil

Figura 2 - Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral segundo município, Brasil 2002



Fonte: SINAN- COVEV/ CGDT/DEVEP/SVS/MS

- Distribuição ampla: N, NE, SE, CO
- Região NE: 90% década 90 para 77% anos 2000
- Urbanização da LV (surto RJ, BH, Araçatuba, Natal, São Luís, Santarém, etc..)

Fonte: Manual de Vigilância e Controle da LV, Min Saúde

Uma doença anunciada

Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras

Revista FAPESP, set 2008

3100/ano no Brasil; 20 dos 26 estados brasileiros

Mais agressiva: matava 3/100, agora 7/100

Atingiu cidades- 8/10 brasileiros em cidades; 30% matas consumidas

Avanço em direção a SP: Gasoduto Brasil-Bolivia, migrações
30km/ano

1999-Araçatuba

Em 9 anos 1258 casos (112 mortes)

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.

CASOS, ÓBITOS e LETALIDADE DE LVA NO ESTADO DE SP

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

DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS HUMANOS DE LVA POR MUNICÍPIO DO ESTADO DE SÃO PAULO – 1999 A 2006

1999

Municípios da DIR VI



Fonte: Div. de Zoonoses

2000

Municípios da DIR VI



Fonte: Div. de Zoonoses

2001

Municípios da DIR VI



Fonte: Div. de Zoonoses

2002

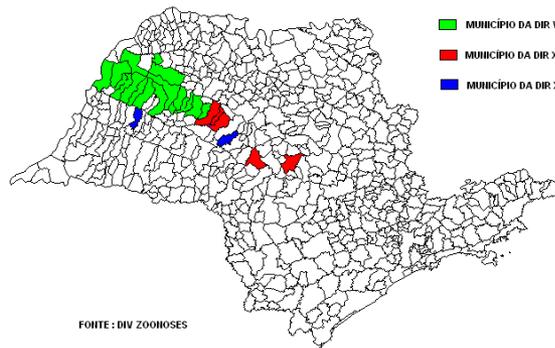
Municípios da DIR VI
Municípios da DIR X



Fonte: Div. de Zoonoses

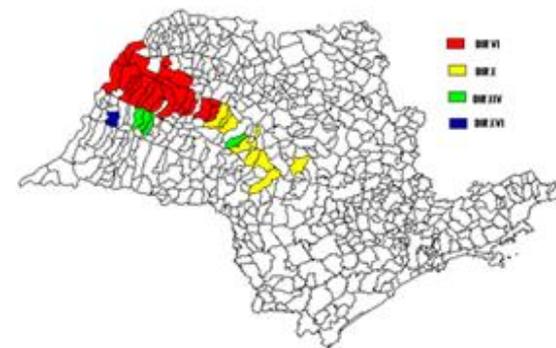
2004

MUNICÍPIO DA DIR VI - ARAÇA
MUNICÍPIO DA DIR X - BAURÚ
MUNICÍPIO DA DIR XIV - MARI



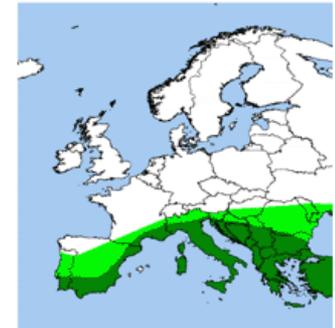
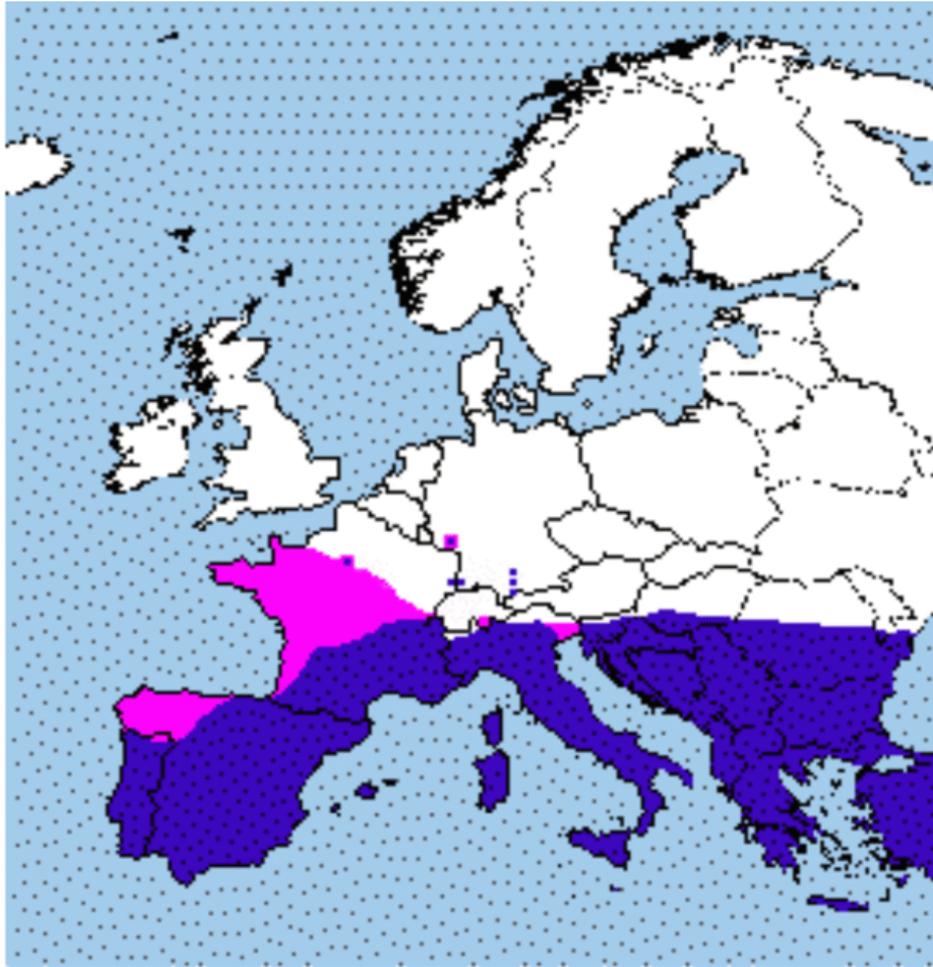
FOITE : DIV ZOOHOSES

2006



FOITE: DIV ZOOHOSES JENI

Leishmaniose Visceral na Europa



Blue = distribution of visceral leishmaniasis

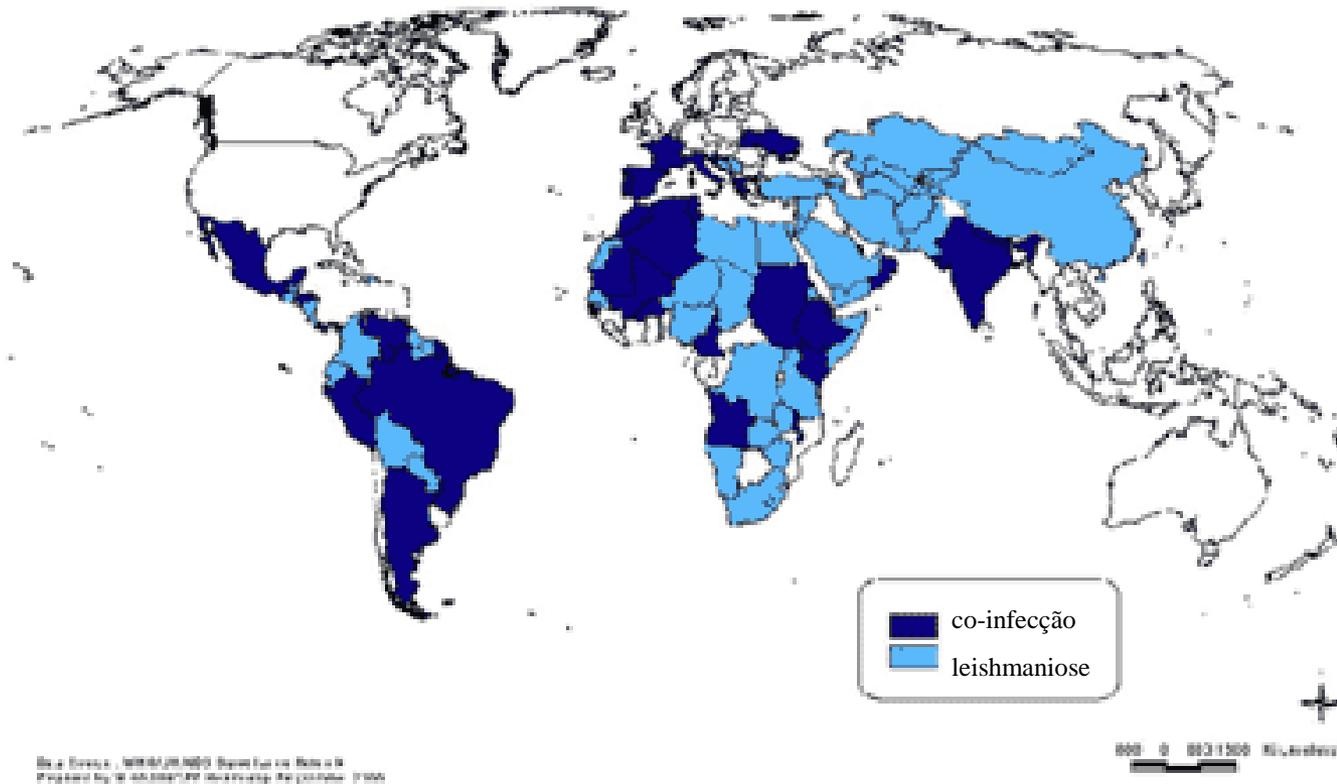
Red = distribution of the visceral leishmaniasis vector sandflies

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



28 Surveillance Centres for Leishmania & HIV Co-Infections

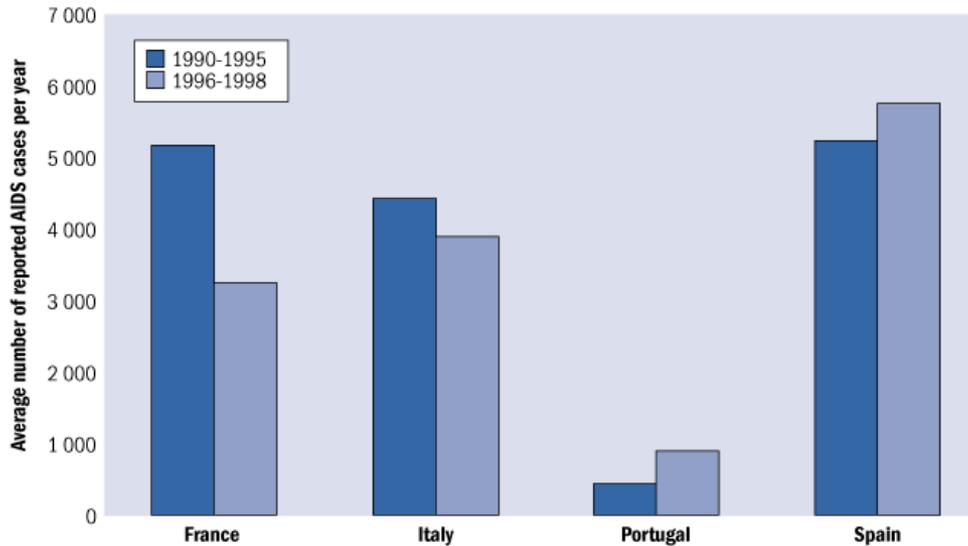


Source: WHO (COSMED) / UNAIDS
Surveillance Network, 1999

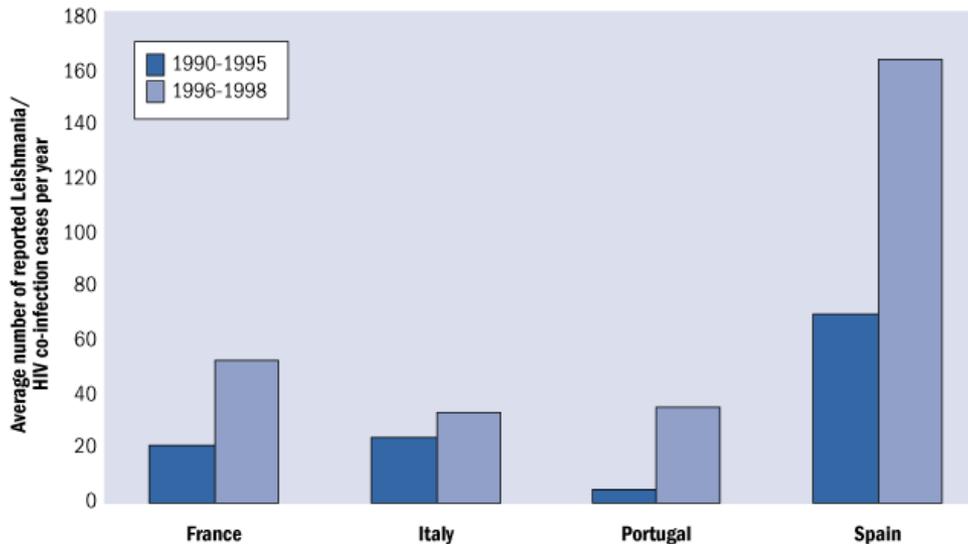
WHO/UNAIDS: same guidelines for diagnosis and a computerized case report form, both endorsed by WHO

Europa: 1990 - 1995
1996 - 1998

Casos de AIDS



Casos de co-infecção AIDS/leishmaniose



Associação entre leishmaniose visceral e AIDS

Leishmaniose visceral acelera AIDS

HIV ativa leishmaniose em portadores antes assintomáticos

1,5-9 % indivíduos com AIDS tem leishmaniose visceral

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

Tratamento HIV reduz *Leishmania*

Intracellular Survival of *Leishmania* Species That Cause Visceral Leishmaniasis Is Significantly Reduced by HIV-1 Protease Inhibitors

Nathalie Trudel,¹ Ravendra Garg,¹ Nadine Messier,¹ Shyam Sundar,² Marc Ouellette,¹ and Michel J. Tremblay¹

¹Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, and Département de Biologie Médicale, Université Laval, Québec, Canada; ²Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi, India

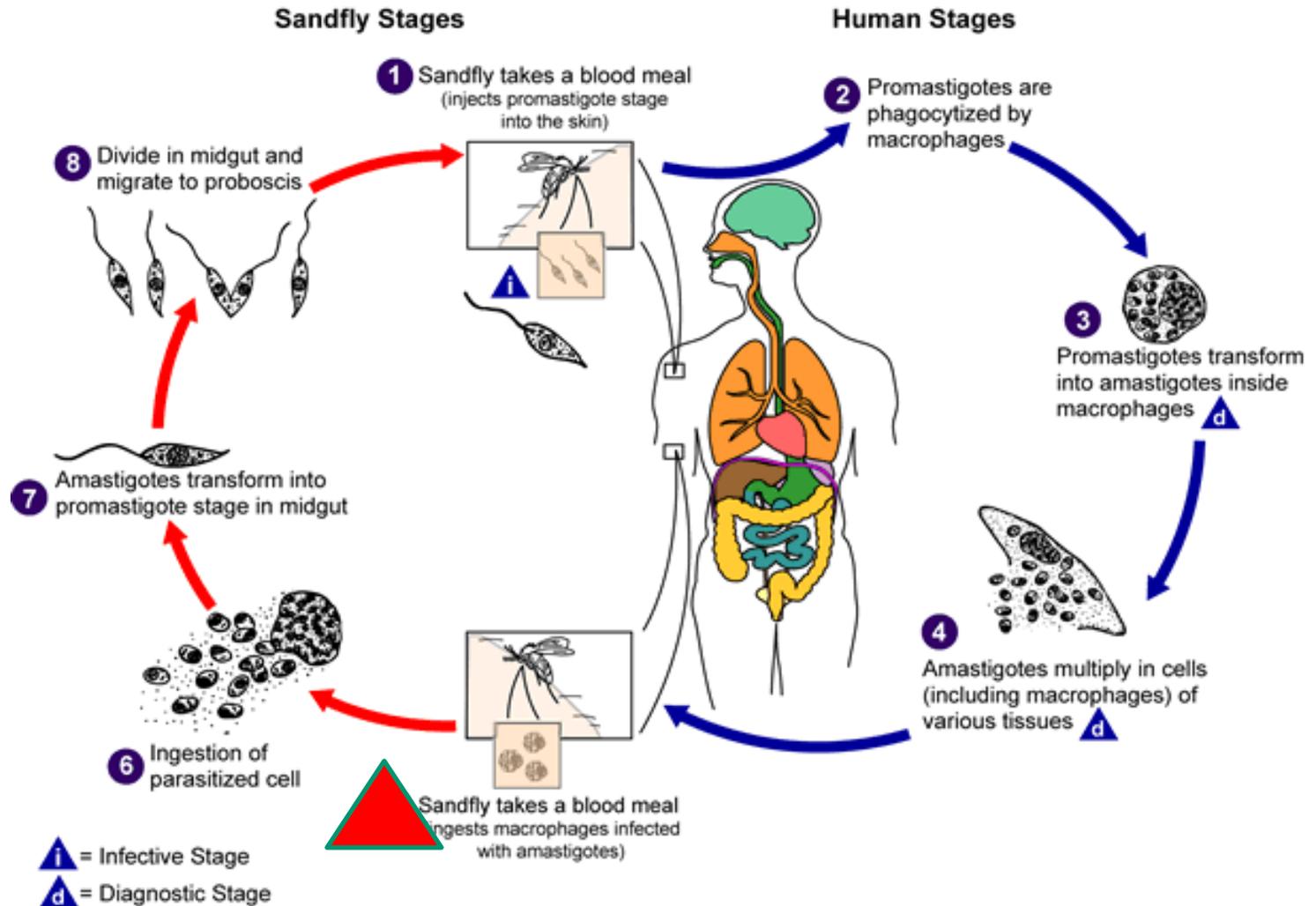
The Journal of Infectious Diseases 2008; 198:1292–9

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved

Nelfinavir, an HIV-1 Protease Inhibitor, Induces Oxidative Stress–Mediated, Caspase-Independent Apoptosis in *Leishmania* Amastigotes

Pranav Kumar, Robert Lodge, Nathalie Trudel, Michel Ouellet, Marc Ouellette, Michel J. Tremblay*

CICLO



VETORES

Insetos flebotomíneos (Ordem Phlebotominae 500spp)

30spp vetoras



***Lutzomyia* e
Psychodopigus nas
Américas**

***Phlebotomus* na
África, Europa e Ásia**

**“Mosquito palha”,
birigui**

VETORES



2-3mm, corpo e asas peludas

Marrons “luminosos” (oleosidade)

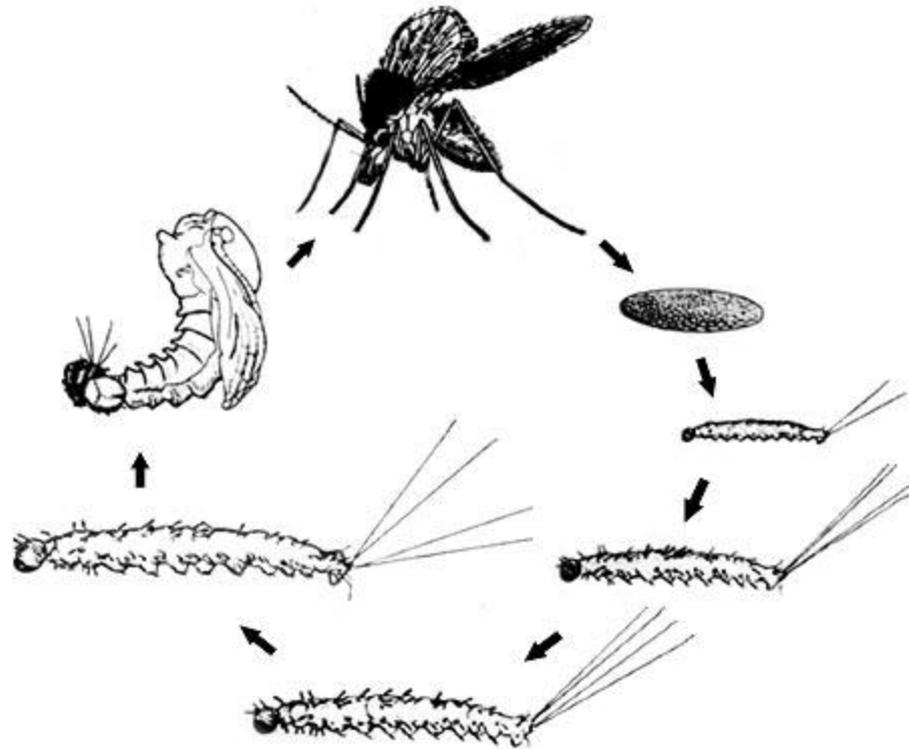
Asas em V

Regiões tropicais e temperadas (20 a 30 graus)

A fêmea se alimenta de sangue no entardecer/noite,
vôo curto (até 100m), baixo e direto

Picada dolorida- “bebem” sangue da ferida

Insetos flebotomíneos



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!

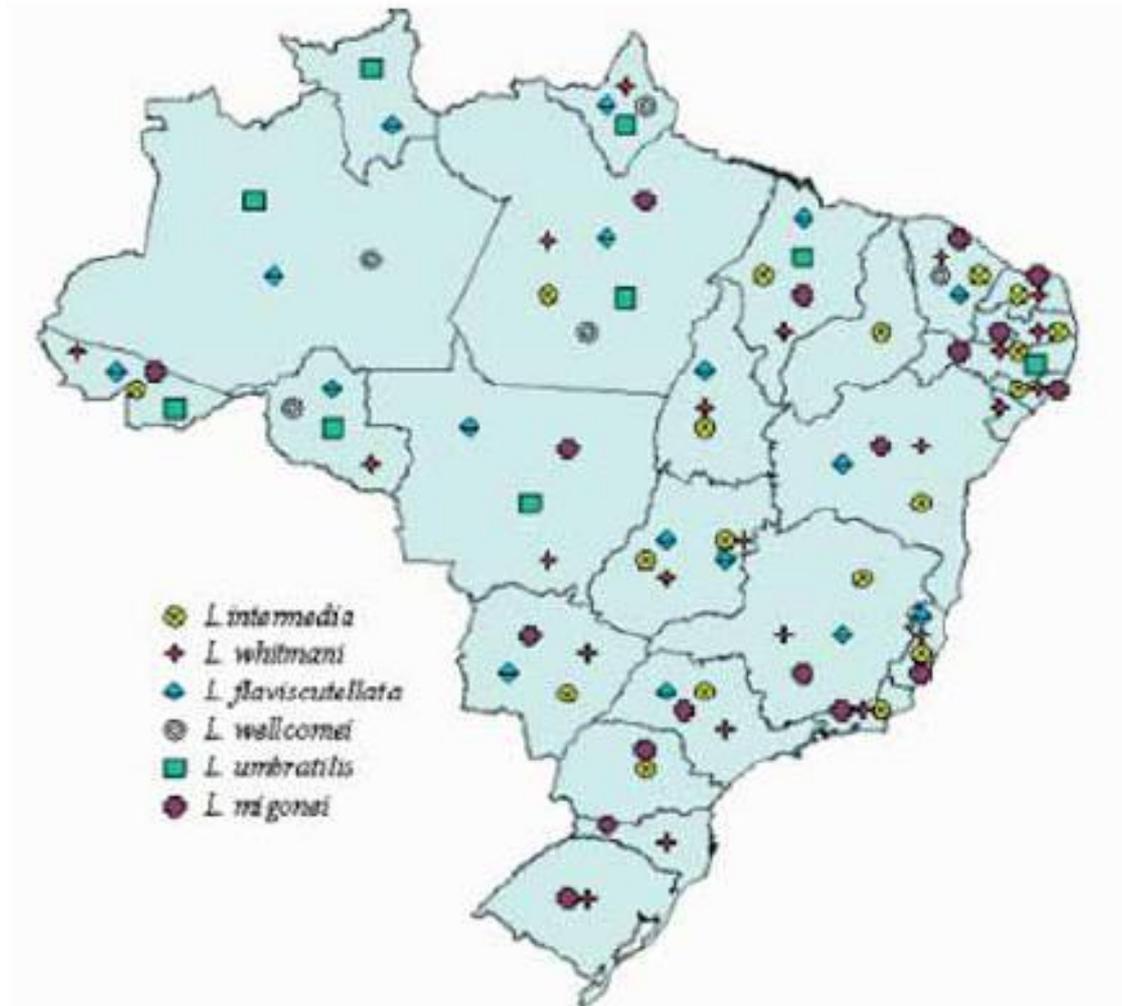
VETORES



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

VETORES DE LTA NO BRASIL

Figura 10 – Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetoras da leishmaniose tegumentar americana no Brasil, 2005.



Leishmaniose visceral: *Lutzomyia longipalpis*

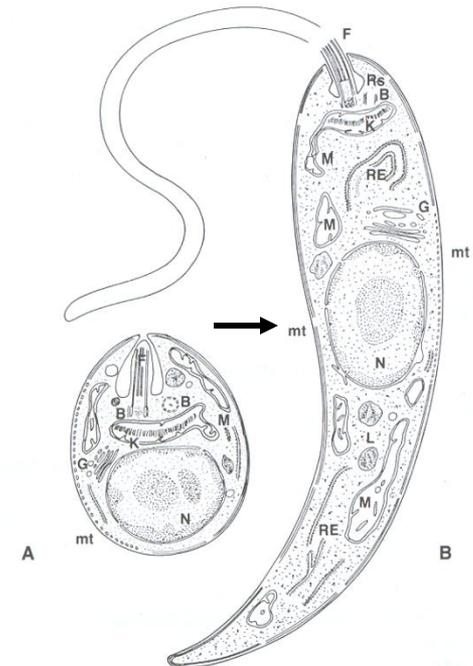
TRANSFORMAÇÃO AMASTIGOTA-PROMASTIGOTA

Alterações do microambiente: do fagolissomo ao intestino do inseto

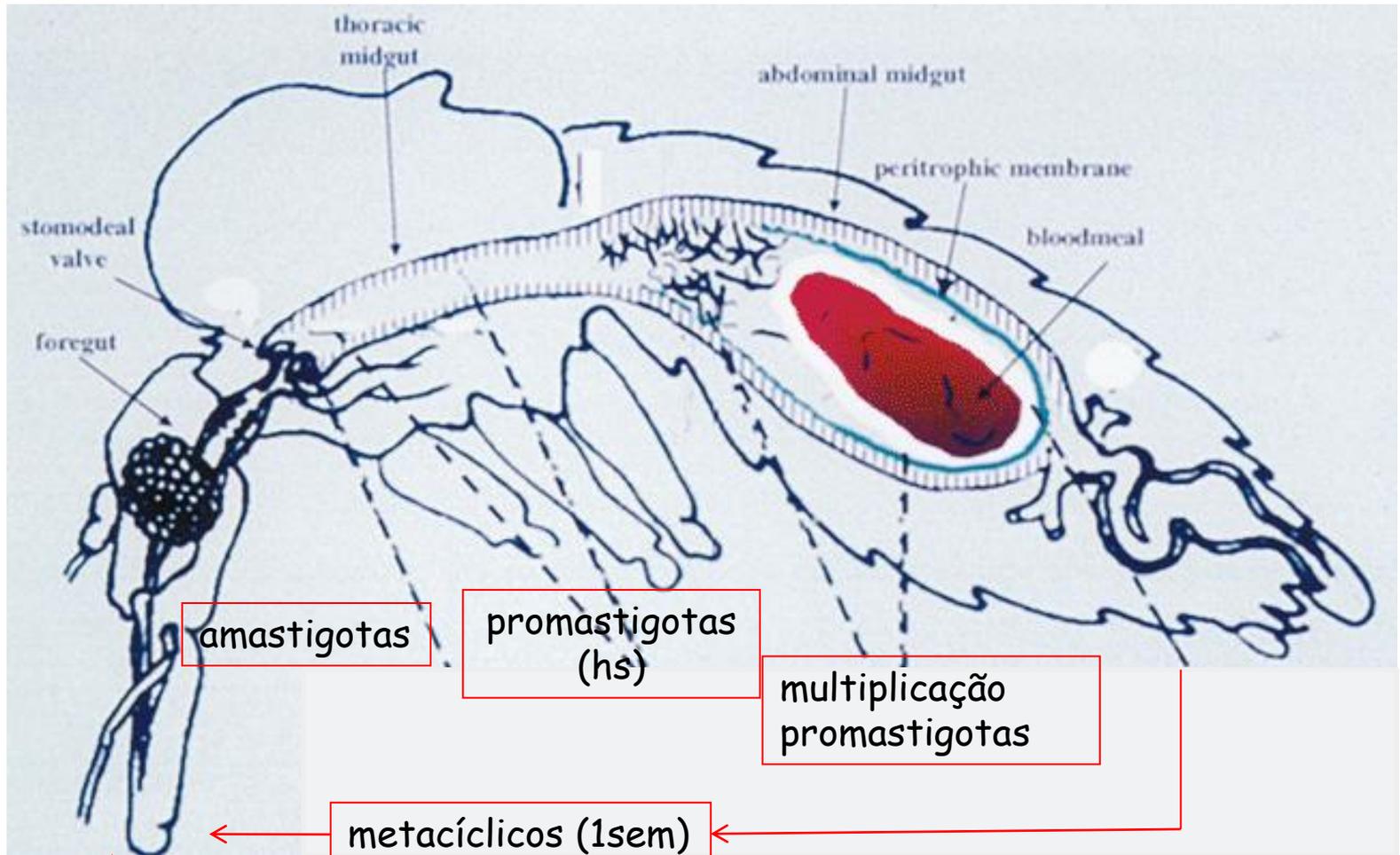
Cresce 5 vezes

Desenvolve flagelo (1 a 2 vezes seu tamanho)

Passa a expressar gp63 e LPG (majoritária)



DESENVOLVIMENTO NO VETOR



Macrófagos infectados

Desenvolvimento no vetor: 10 dias (4 a 25)

<http://www.liquidjigsaw.com/science/animation/animations/leishmaniasis/leish-lifecycle-in-sandfly.html>

SOBREVIVÊNCIA NO VETOR

Metaciclogênese: vários estágios

Sistema digestivo inseto: enzimas

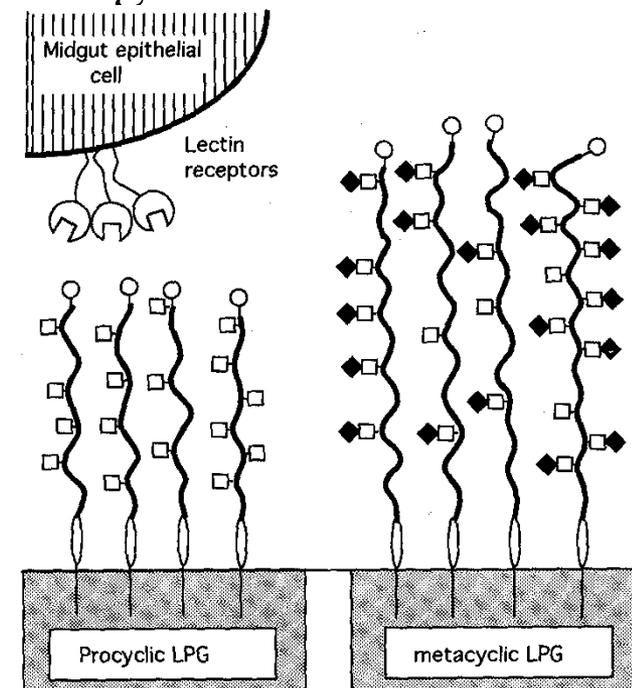
Estágios vulneráveis não são expostos a proteases do inseto

Parasita tem quitinase que rompe membrana peritrófica do intestino médio do inseto e permite chegada na glândula salivar

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

Saliva do vetor:

a. induz vasodilatação,

b. previne a coagulação,

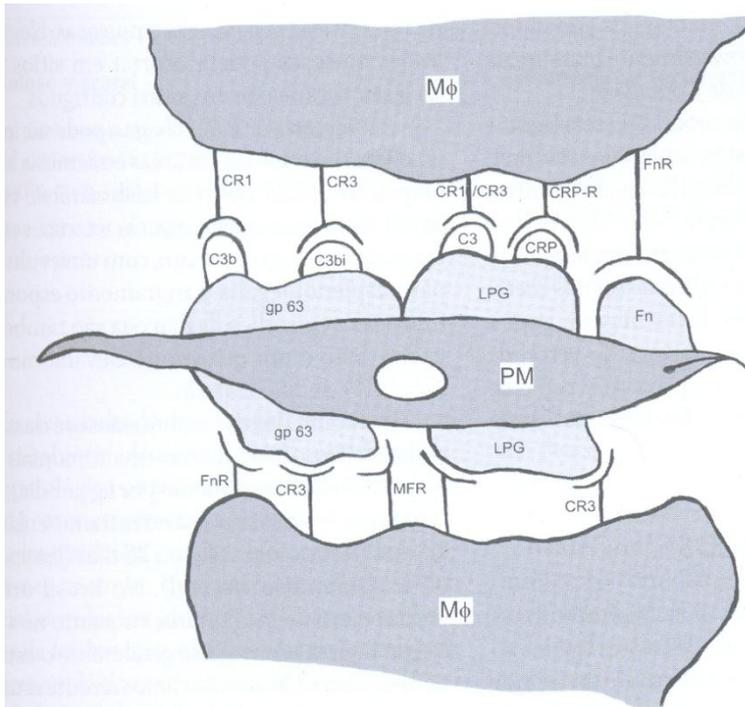
c. tem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias
(inibe ativação de macrófagos)

ADESÃO DE PROMASTIGOTA AO MACROFÁGO

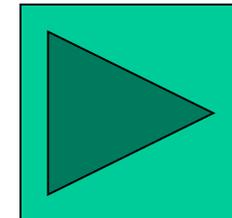
Fagocitose “facilitada”

gp63, LPG, PPG, PS (apoptose)

CR, FnR, MR, CRP, PS-R



Ferreira *et al*, 2003



Mecanismos de evasão

LPG inibe o burst oxidativo

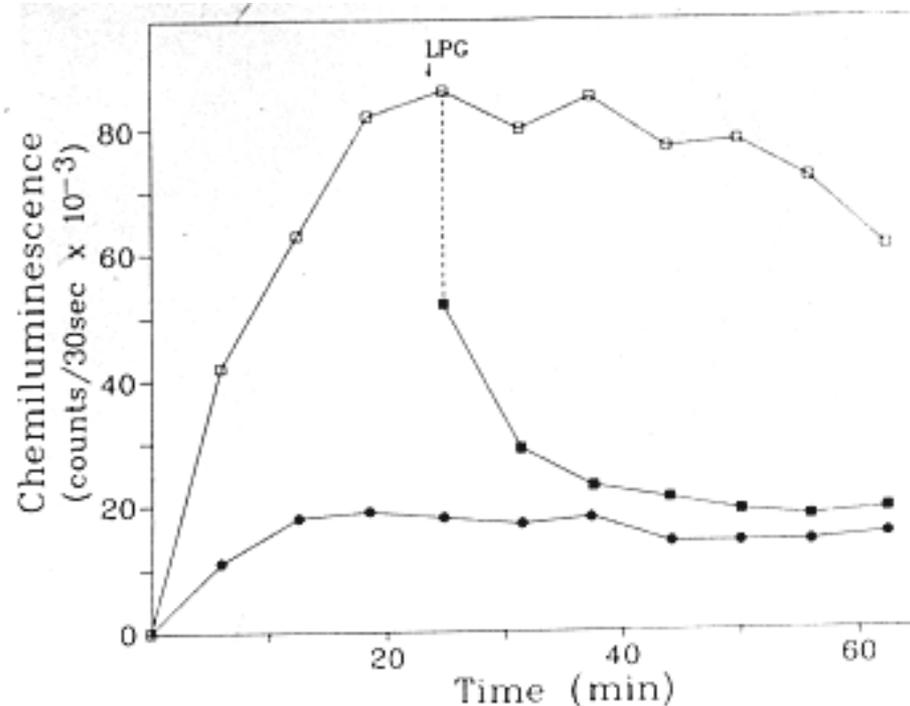
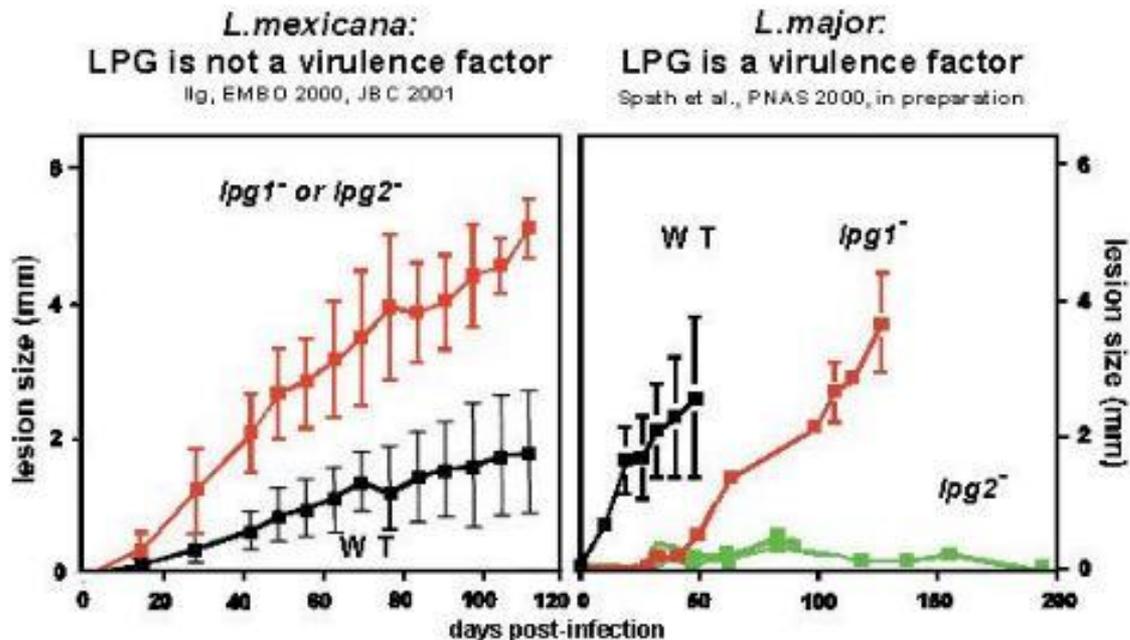


Figure 5. Attenuation of the oxidative burst in stimulated monocytes. Monocytes either in the presence (●—●) or absence (□—□) of LPG (100 μ M) were incubated for 10 min at 22°C and then stimulated by PMA (10 μ g/ml) and the oxidative burst measured. At the 20 min time point, LPG (100 μ M) was added to 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 knock out mutants in different species show BIG differences in virulence



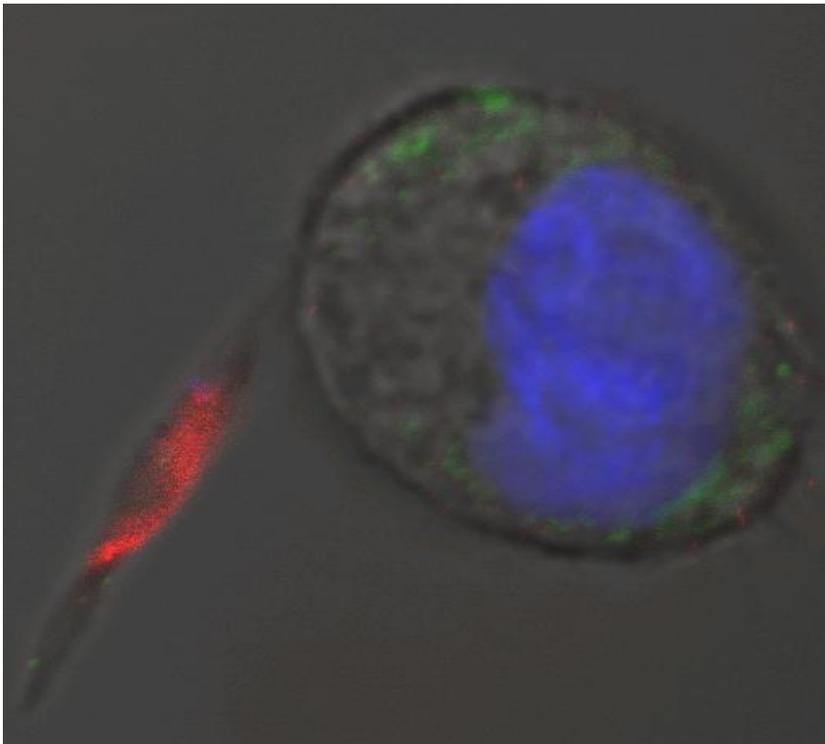
L. major & *L. mexicana* are as divergent as humans & mice (~ 80 MYR)

SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO

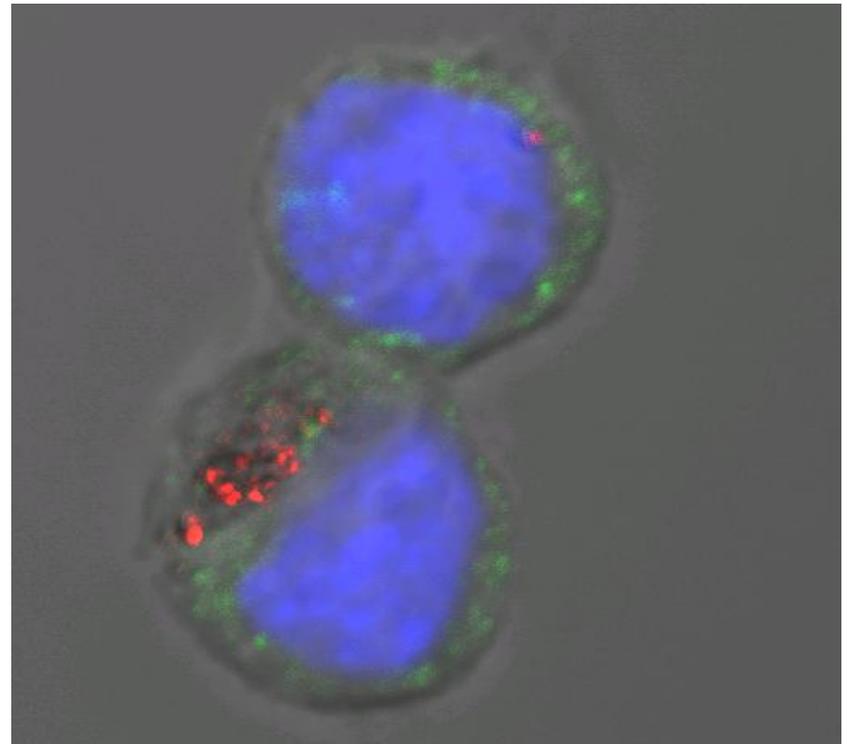
Após fagocitose (5 a 60min), promastigotas no vacúolo parasitóforo
Retardo da fusão de lisossomos → fagolisossoma (acidificação)

Promastigotas → amastigotas

30min

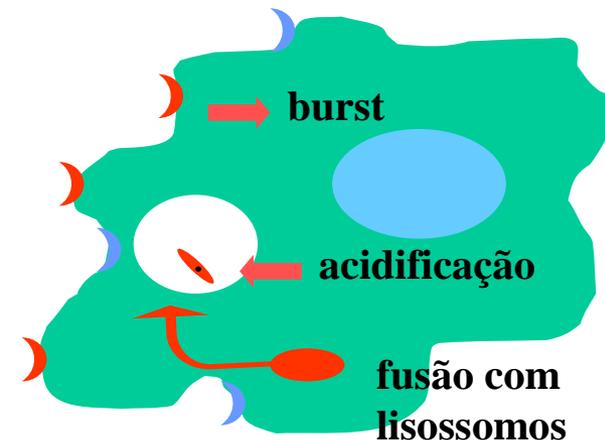


4h

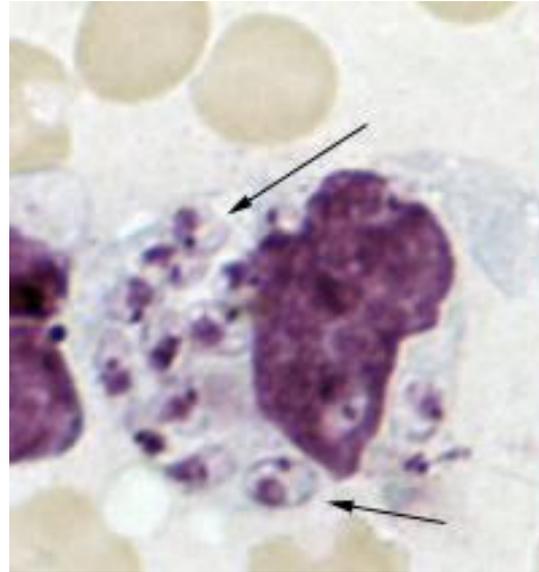


SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO

- gp63 (protease) inativa complemento: C3b-C3bi (liga 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



SOBREVIVÊNCIA NO MACRÓFAGO



CDC

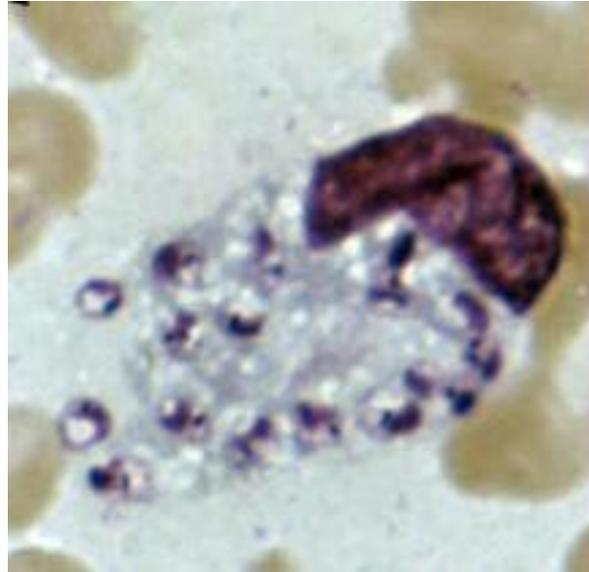
Leishmaniose visceral: *L.donovani*, *L.infantum* ou *L.chagasi*

Resistência a temperatura de 37°C- visceralização?

Imunossupressão por LPG: reduz IFN γ e IL12, aumenta TGF β e IL10

Homem: amastigotas em macrófagos de gânglios linfáticos, baço, fígado, medula óssea, raramente da pele (exceção: Índia, Sudão)

LIBERAÇÃO DE AMASTIGOTAS DOS MACRÓFAGOS



CDC

Os amastigotas liberados podem infectar novas células
Diferenças: não tem gp63, algumas espécies não tem LPG
Mecanismos diferentes de adesão? (PPG?)

Mecanismos de escape do Sistema Imune

Fagocitose silenciosa via receptor de complemento
gp63 inativa complemento

Redução MHC II no macrófago

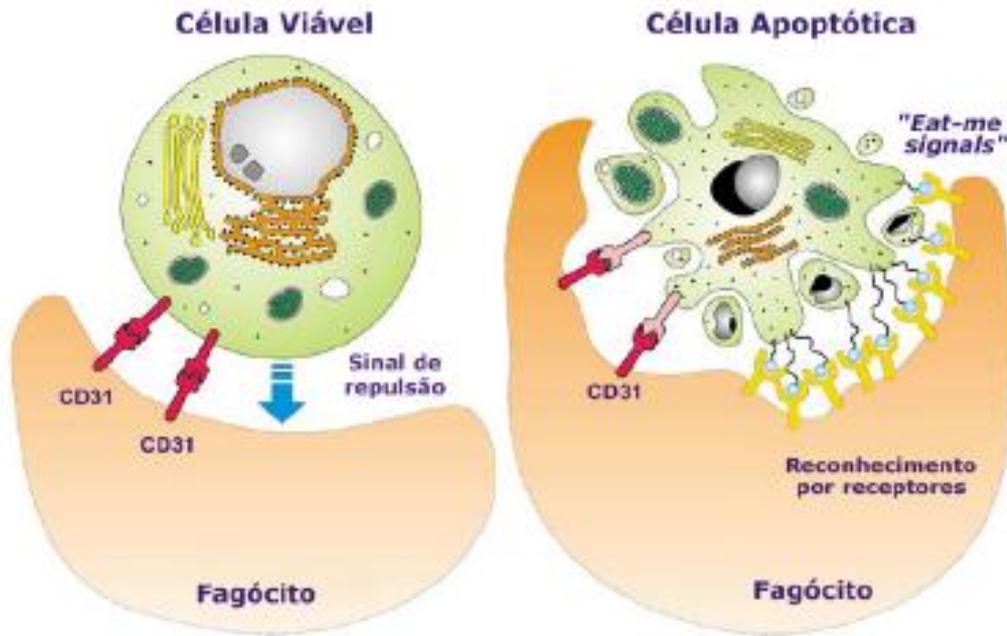
Uso de IL2, redução de IL1 e IFN γ

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

Apoptose e mimetismo apoptótico

Fagocitose por neutrófilos

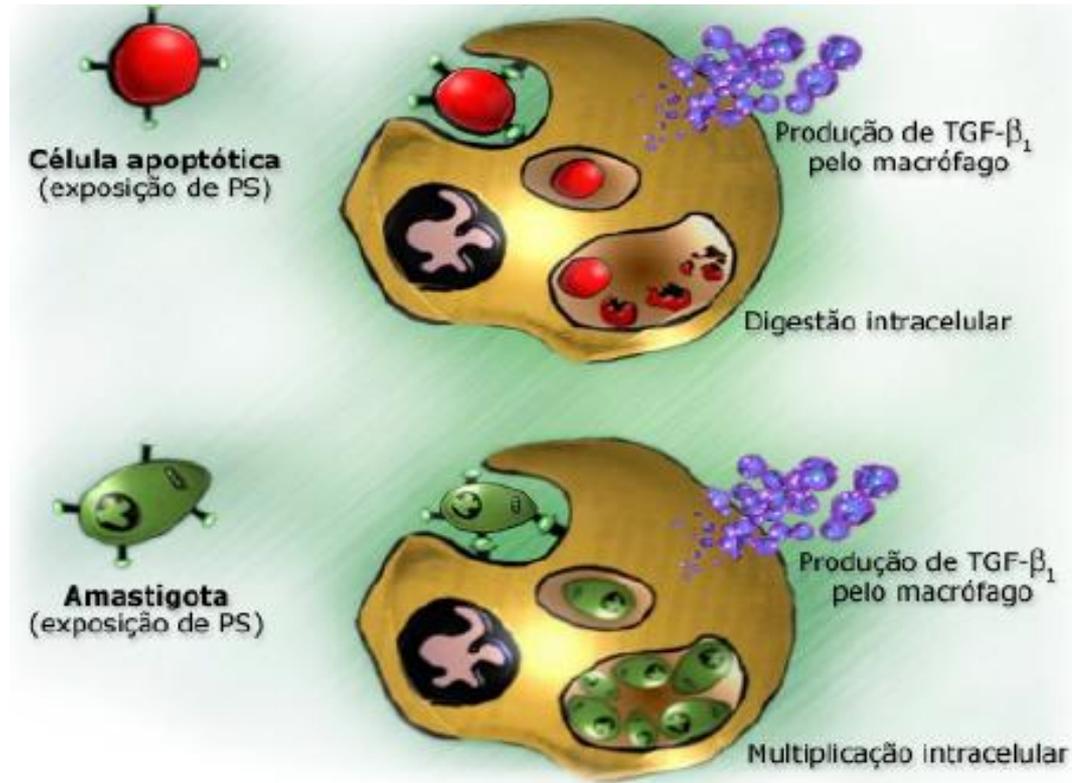
Apoptose (promastigotas)



Modificado de Lauber *et al.*, 2004;
Deolindo, 2008

Promastigotas apoptóticas “altruístas” induzem produção de TGF β e inativam macrófago

Mimetismo Apoptótico (amastigotas)



Deolindo, 2008

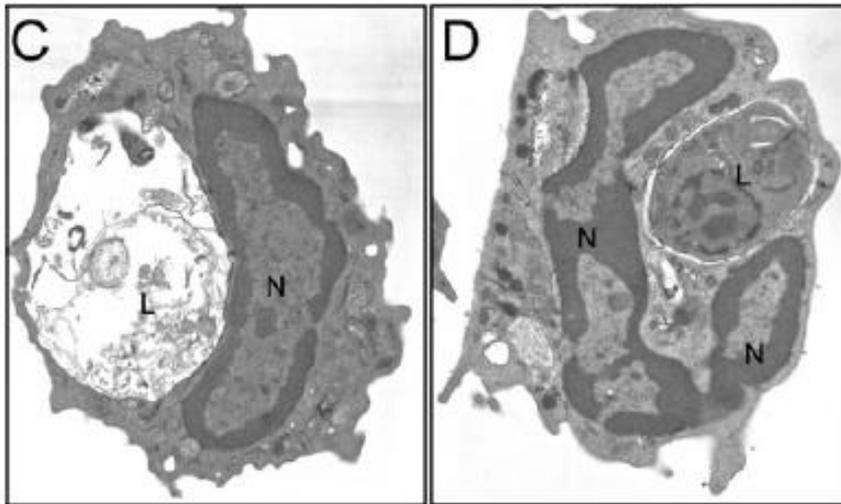
Amastigotas expõem PS mas não entram em apoptose

Neutrófilos e *Leishmania*: Cavalo de Tróia?

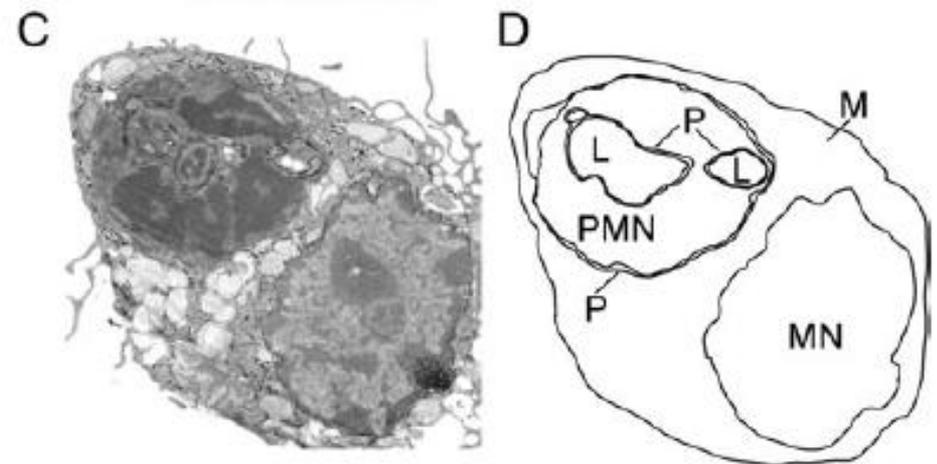
Rápido recrutamento de neutrófilos após inoculação (30min).

LPG inibe lise em alguns neutrófilos

Neutrófilos em apoptose (horas) são fagocitados por macrófagos.



Leishmania donovani em neutrófilos



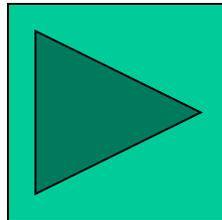
Macrófago fagocita neutrófilos com *L. donovani*

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

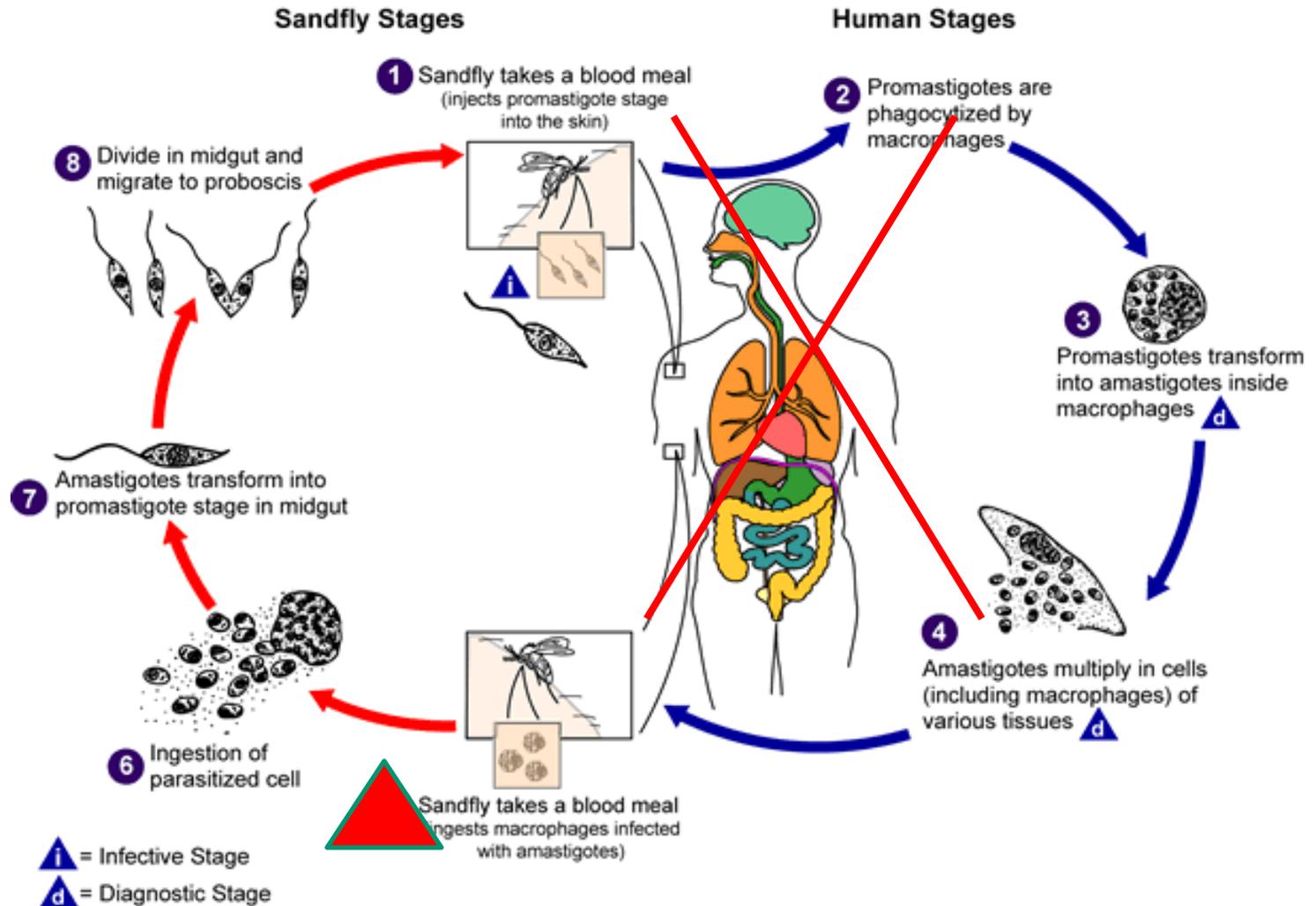
Nathan C. Peters,^{1*} Jackson G. Egen,^{2*†} Nagila Secundino,¹ Alain Debrabant,³ Nicola Kimblin,¹ Shaden Kamhawi,¹ Phillip Lawyer,¹ Michael P. Fay,⁴ Ronald N. Germain,^{2‡} David Sacks^{1†‡}

Science, ago 2008

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



CICLO



RESERVATÓRIOS



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 e cavalos

L.amazonensis: marsupiais, pequenos roedores

RESERVATÓRIOS

Visceral: canídeos (doença variável)

Amastigotas em macrófagos da pele: importante para transmissão!

No Brasil:

L.chagasi: cães, raposas e provavelmente marsupiais



PATOGENIA

Formas clínicas

Leishmaniose cutânea- *L. V. braziliensis*,
L. L. amazonensis,
L. V. guyanensis
L. L. major

Leishmaniose difusa - *L. L. amazonensis*

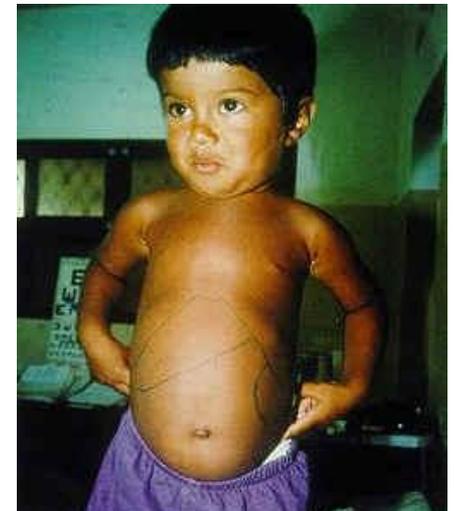
Leishmaniose mucocutânea - *L. V. braziliensis*

Leishmaniose visceral - *L. L. chagasi*, *L. L. donovani*

PKDL

Novo Mundo

Velho Mundo



Quadro clínico- forma cutânea localizada

- L. (V.) braziliensis*
- L. (L.) amazonensis*
- L. (V.) guyanensis*
- L. (L.) mexicana*



2-8 sem após infecção

Lesões únicas ou limitadas, úlceras com bordas elevadas



Quadro clínico- forma cutânea difusa

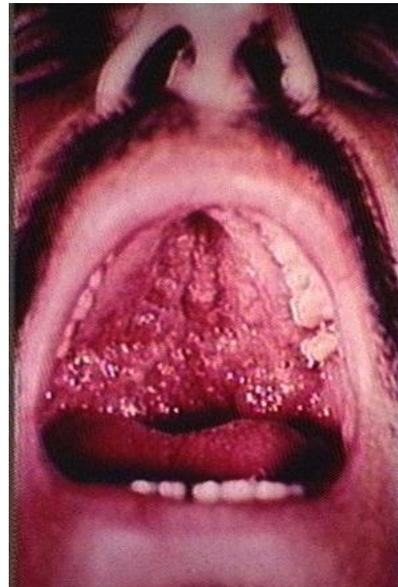
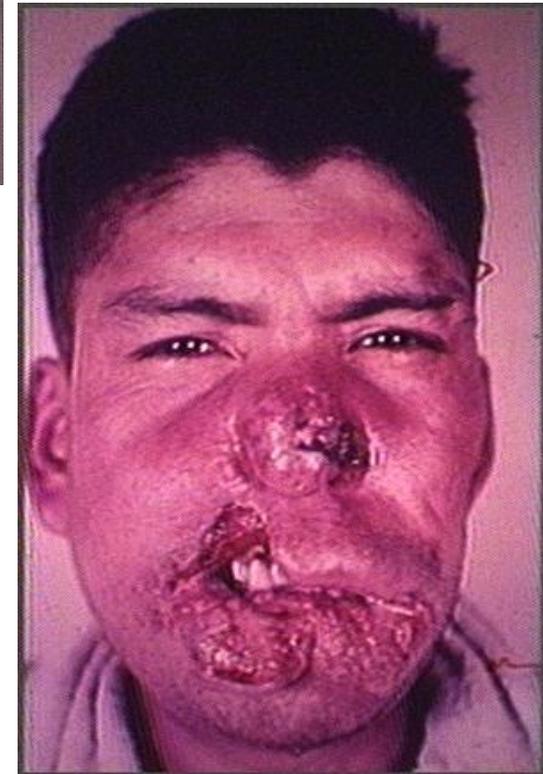
L. (L.) amazonensis



- Anergia da resposta imune-paciente não responde à *Leishmania*
- Múltiplas lesões nodulares disseminadas (lepra branca)
- Difícil tratamento
- Rara

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

L. (L.) donovani

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: 1:2,6-11:1 no Sudão,
8:1-18:1 no Brasil



Resposta imune

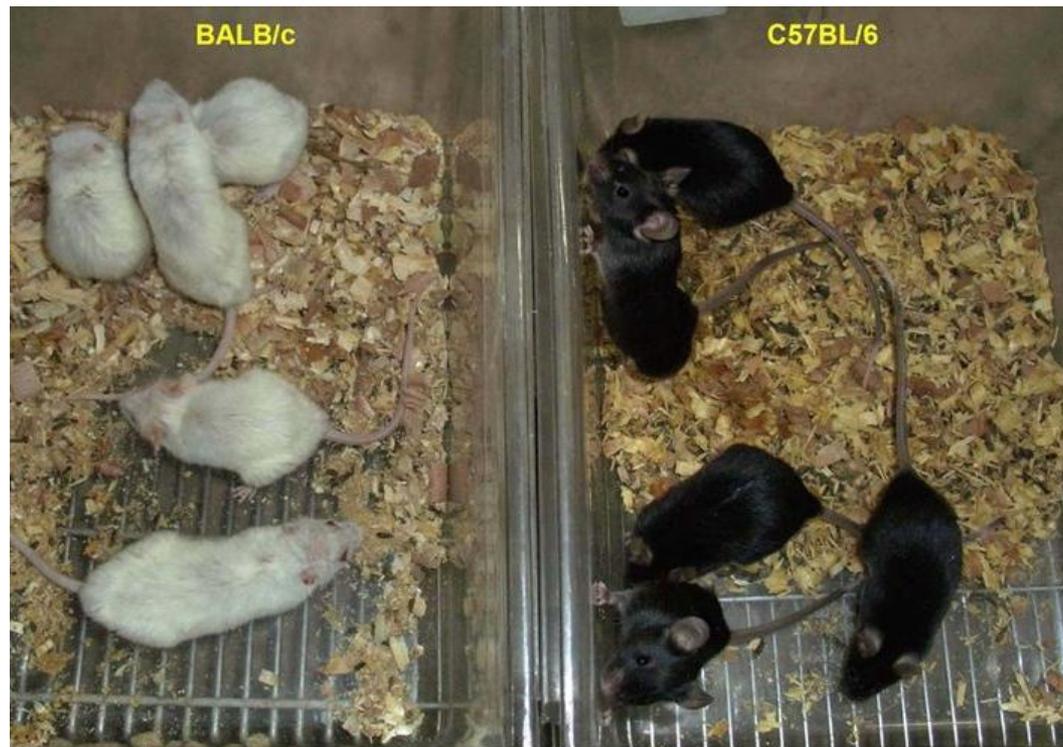
RECIPROCAL EXPRESSION OF INTERFERON γ OR INTERLEUKIN 4 DURING THE RESOLUTION OR PROGRESSION OF MURINE LEISHMANIASIS

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



Modulação da Resposta imune

Leishmania major

Macrófago infectado

Ativação do "burst respiratório" e produção de NO

Apresentação de antígenos na superfície

Respostas

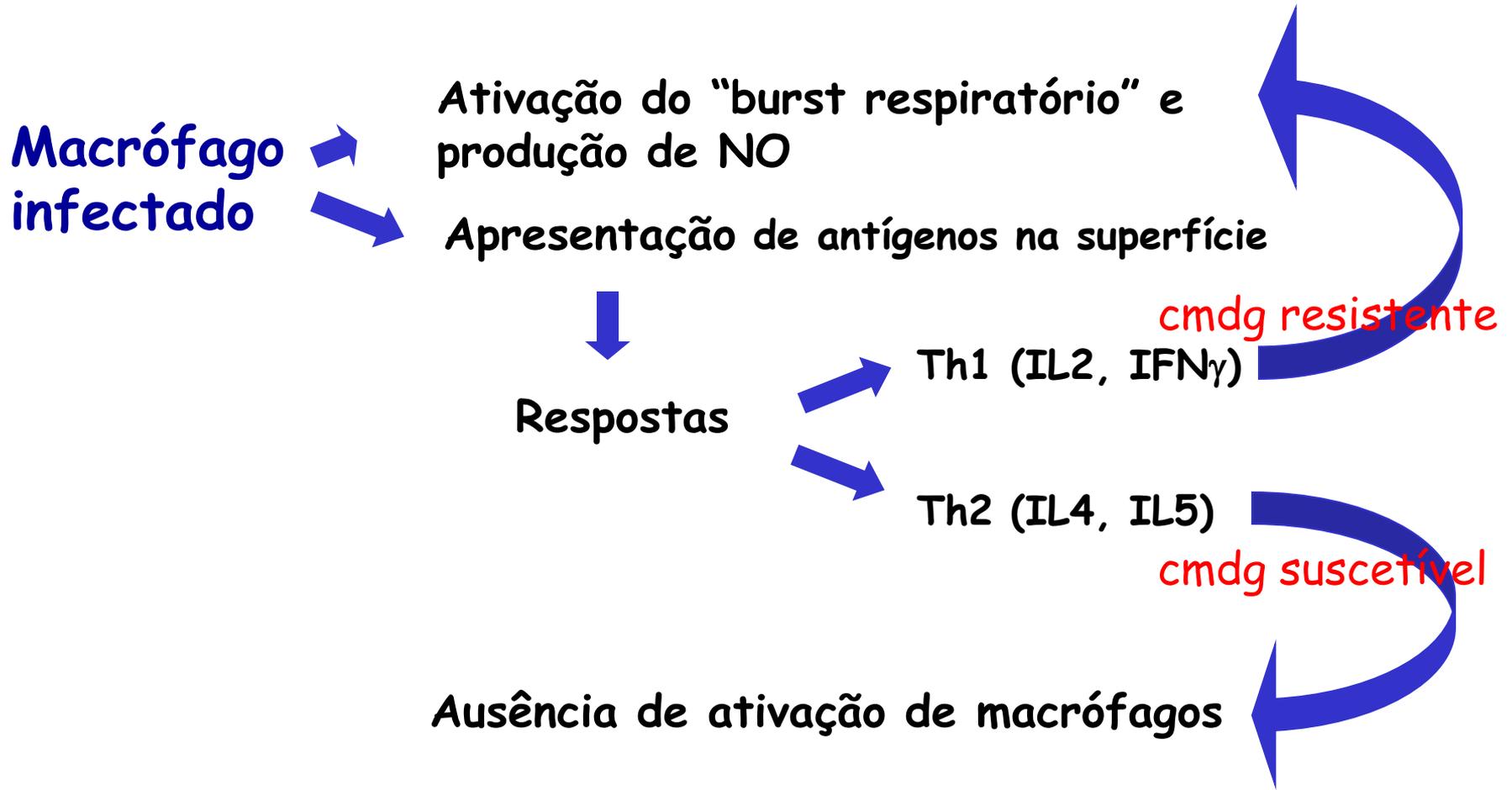
Th1 (IL2, IFN γ)

cmdg resistente

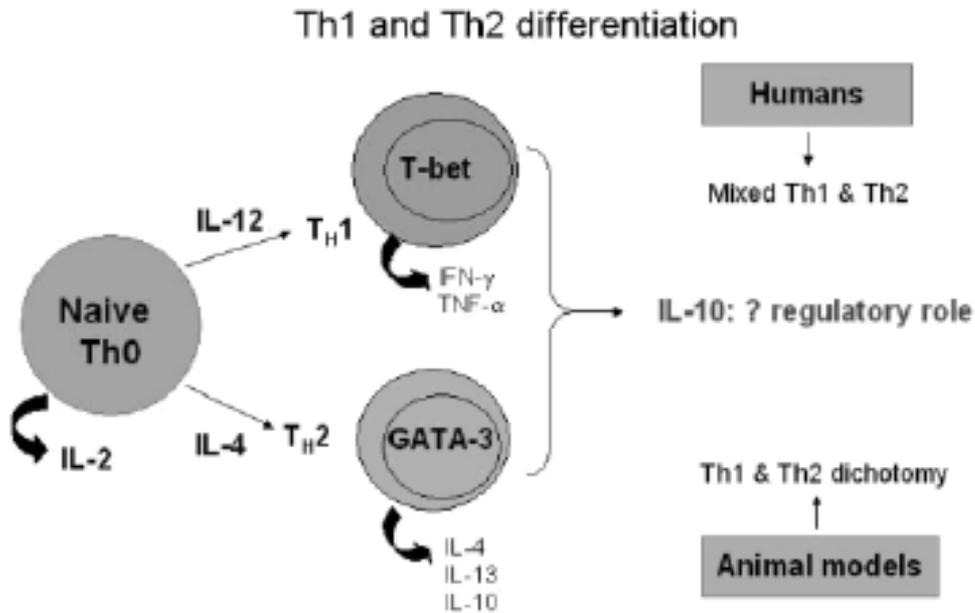
Th2 (IL4, IL5)

cmdg suscetível

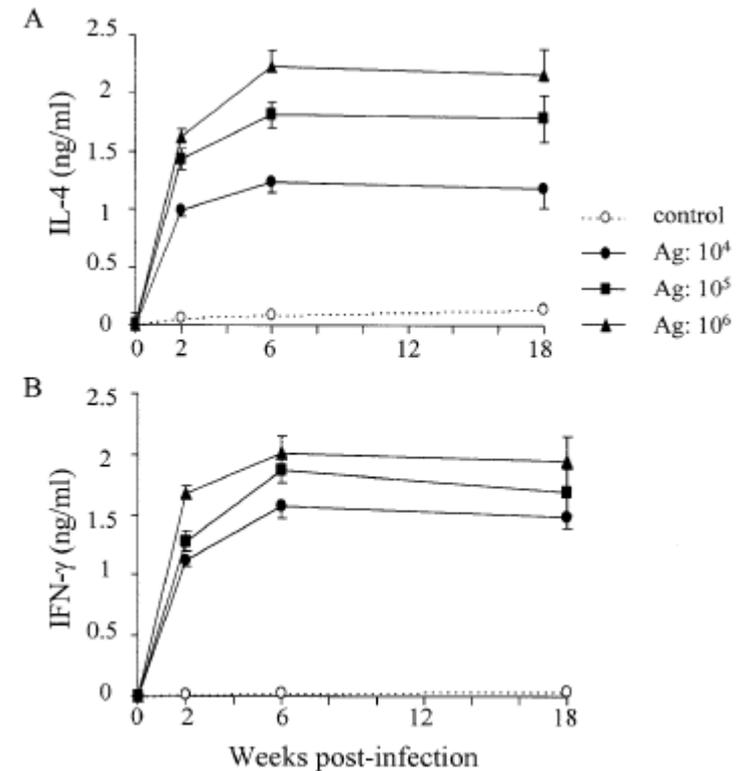
Ausência de ativação de macrófagos



Homem ≠ camundongo, *L. amazonensis* ≠ *L. major*



Leishmania amazonensis em BALB/C: mixed Th1/Th2 response



DIAGNÓSTICO

Parasitológico

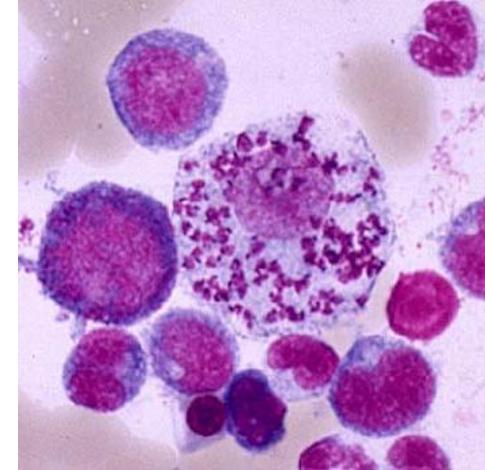
Histopatologia ou citologia: aspirados/biópsias de lesão ou medula óssea/linfonodos. Altamente específico e baixo custo, mas baixa sensibilidade

Imunológico

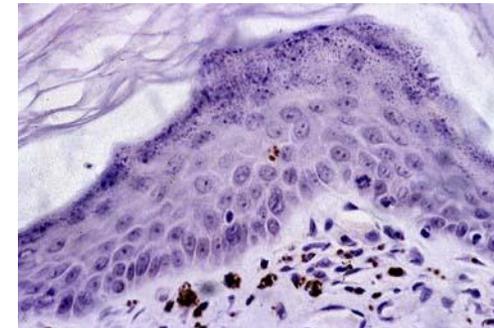
ELISA (muito sensível, pouco específico) ,

DAT (=aglutinação direta)

Resposta celular: Reação intradérmica
(hipersensibilidade tardia)

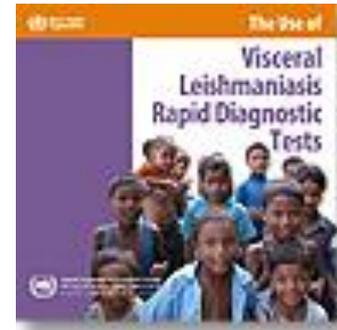


Medula óssea de cão (Wright-Leishman stain)



Pele de cão (imunohistoquímica)

DIAGNÓSTICO



Tegumentar:

Parasita na lesão (escarificação, aspiração, biópsia)

Baixa sensibilidade, cultivo ou inoculação em animal

Reação intradérmica=Teste de Montenegro (1926)-48h

Visceral:

Punção de baço, fígado, medula óssea (cultivo)- risco

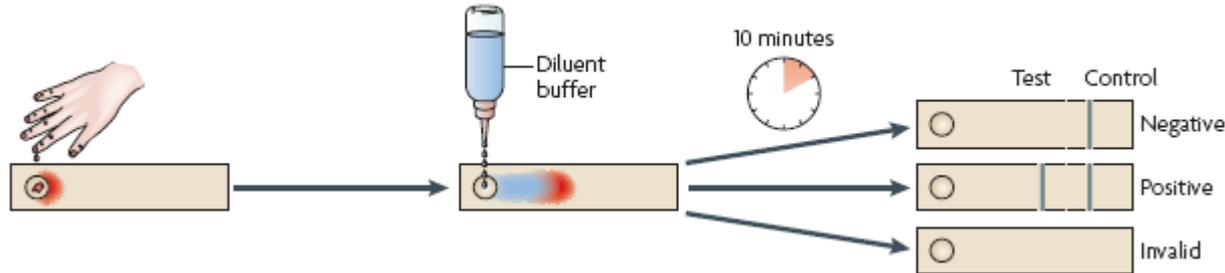
Sorologia imprecisa: boa sensibilidade, má especificidade (reação cruzada) e positividade após cura

Teste Montenegro negativo (positivo após cura)

DIAGNÓSTICO

leishmaniose visceral

rK39 strip test- dipstick (ELISA)



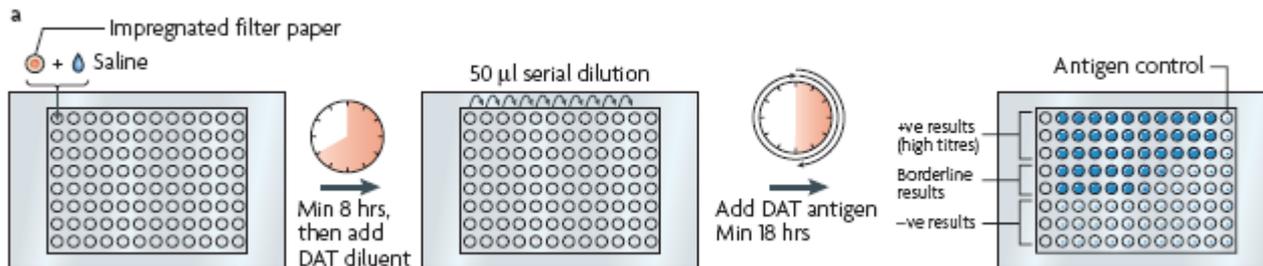
K39=kinesin-related protein

Sensibilidade e especificidade de 94 e 95% (US\$1)

DAT: aglutinação direta

Diluição soro paciente-ag parasitas marcados-aglutinação visível

Sensibilidade e especificidade de 94 e 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

Resistência na Índia (VL Bihar: 6-8x dose curou 1/3)

2. Anfotericina B: intravenoso, tóxico, hospitalização

- Liposomal (AmBisome®): melhor mas caro (US\$ 2800/tto)

-Interage com ergosterol da membrana do parasita, tornando-a permeável a íons e pequenas moléculas.

Pouca/nenhuma resistência

3. Pentamidina: altera a estrutura do cinetoplasto e síntese de poliaminas. Resistência na Índia

Miltefosine: primeira droga oral, cara (US\$200) e teratogênica (proibida para gestantes). Desde 2002

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

Tratamentos disponíveis:

Difícil administração,
longo, tóxico, caro,
resistência

≠

Tratamento ideal:

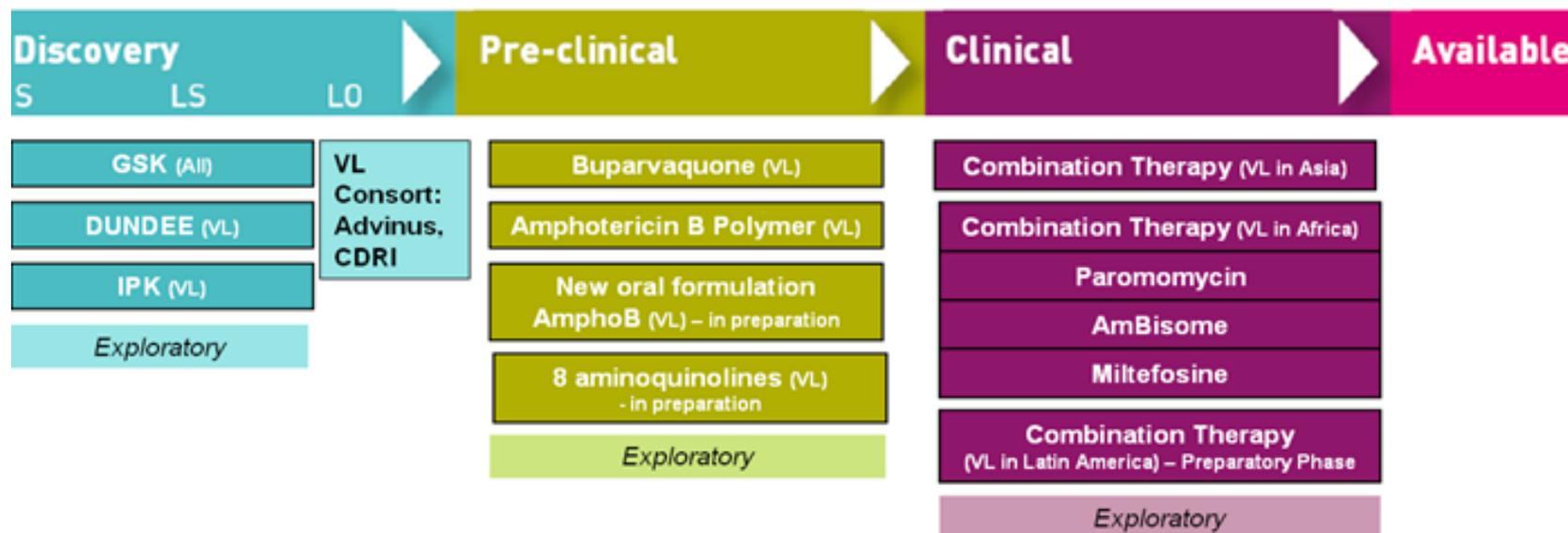
oral, seguro, eficaz, baixo
custo, curta duração (~10
dias)

PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO?

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

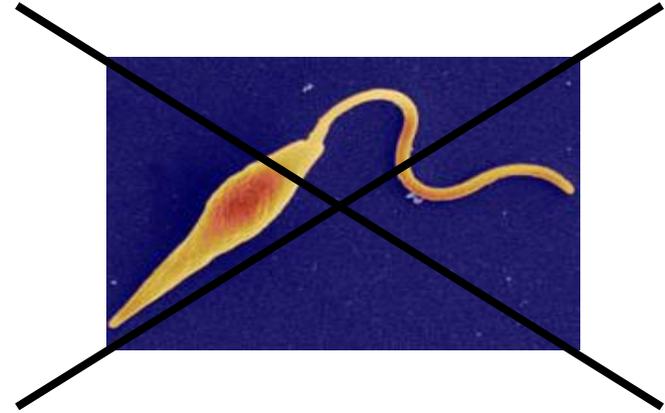


DNDi R&D VL Projects – 2009 Outlook



VL is the primary disease target for DNDi, CL is secondary
2,357,000 DALYs

PERSPECTIVAS DE CONTROLE



1-Vetor? Doméstico x Silvestre

India: hábitos domésticos (DDT eficaz 1950)

2-Reservatório? Doméstico x Silvestre

Tratamento de cães? Problemas: diagnóstico, reinfeção e sacrifício

3-Paciente infectado: tratamento interfere no controle?

Reservatório → Vetor → Homem (exceção: Índia)

4-Mudança de hábitos/habitações, reduzir desmatamento

VACINAS

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

Antígenos são relativamente conservados entre espécies:
gp63, LACK, PSA2, TSA/LmST11, PFR2, A2, HASPB1,
vacinas de DNA ... Resultados pouco animadores

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

Alternativa: manipulação da resposta imune?

Vacina de DNA de Hsp65 *M. leprae* reverte resposta Th2 → Th1

VACINAÇÃO COM ESPÉCIES NÃO PATOGÊNICAS?

Vacinação camundongos BALB/C com *L. talentolae*:

- Estimulou maturação de células dendríticas
 - Induziu proliferação de céls T CD4 produtoras de IFN γ (Th1)
 - Uma imunização: proteção contra *L. donovani*
- Teste em humanos?

VACINAS EM CÃES

Particular: Leishimune

Eficiência questionável e dificuldade de seguimento/
diagnóstico de infecção

Opção: controle por uso de coleiras impregnadas

