



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELLE CAVALCANTE NUNES

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIRIMIDINAS SINTÉTICAS CONTRA *Leishmania*
amazonensis e *L. chagasi***

Maceió - AL

2024



ISABELLE CAVALCANTE NUNES

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIRIMIDINAS SINTÉTICAS CONTRA *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Coorientadora: Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Maceió - AL

2024



Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

N972a Nunes, Isabelle Cavalcante.

Avaliação biológica de pirimidinas sintéticas contra *leishmania amazonensis* e *L.chagasi* / Isabelle Cavalcante Nunes. – 2024.

41 f. : il.

Orientadora: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.

Coorientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas :
Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 40 - 41.

1. Leishmaniose. 2. Leishmaniose - Epidemiologia. 3. Pirimidinas sintéticas.
4. Leishmaniose - Tratamento. I. Título.

CDU: 57: 616.993.61



ISABELLE CAVALCANTE NUNES

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIRIMIDINAS SINTÉTICAS CONTRA *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Assinatura do orientador – Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Assinatura da coorientadora – Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Banca examinadora:

Profa. Dra. Roberta Costa Santos Ferreira

UFAL/ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS

Prof. Dr. Paulo Fernando da Silva Santos Júnior

UFCG/ Departamento de Química

Maceió - AL

2024

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, pelo constante apoio e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Minha sincera gratidão àqueles que contribuíram de forma significativa para a conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela orientação divina e pelas graças derramadas a cada passo deste percurso acadêmico.

À minha família, minha base, agradeço pelo seu encorajamento constante, amor incondicional e apoio nas decisões ao longo dessa jornada desafiadora.

Aos meus amigos, pelas amizades sinceras, estímulos mútuos e momentos de alegria compartilhados nos corredores do ICBS.

Ao Victor, meu amor, presente em cada dificuldade, cujo apoio e compreensão foram fundamentais.

Ao meu orientador, Prof Dr. Edeildo, minha sincera e profunda admiração. Gratidão por tantas horas de bancada e escrita, por cada ensinamento e conselho amigo. O senhor foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo e para o meu crescimento como estudante e pesquisadora.

A cada um de vocês, minha eterna gratidão. Que as bênçãos de Deus estejam sempre com todos nós, guiando-nos a cada passo.

Muito obrigada!

RESUMO

A leishmaniose, uma doença tropical negligenciada (DTN) causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., é transmitida por flebotomíneos infectados e endêmica em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em regiões socioeconomicamente vulneráveis. Os tratamentos disponíveis atualmente apresentam efeitos adversos severos, dificultando a adesão farmacoterapêutica dos pacientes. Este estudo investigou a atividade leishmanicida de 14 novas pirimidinas sintéticas através de ensaios *in vitro* com células fagocitárias e com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os compostos foram avaliados primeiramente quanto à toxicidade em macrófagos de linhagem *J774.A1*, sendo 8, com menor citotoxicidade, posteriormente testados contra promastigotas de *Leishmania* usando a anfotericina B como controle positivo. Os dados foram tratados no software Prisma® para obtenção de parâmetros estatísticos, tais como nível de significância e valores de concentração inibitória para 50% (CI₅₀). Os resultados indicam que os compostos IJS01 (CI₅₀ (μM): 7,09 ± 4,20), IJS04 (CI₅₀ (μM): 15,21 ± 2,43) e IJS07 (CI₅₀ (μM): 22,85 ± 0,88) em promastigotas de *L. chagasi* e os compostos IJS02 (CI₅₀ (μM): 6,978 ± 1,70) e IJS07 (CI₅₀ (μM): 1,642 ± 0,98) em *L. amazonensis* podem ser promissores para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose por apresentarem um efeito inibitório considerável em uma baixa concentração em relação aos demais compostos investigados.

Palavras-chave: *Leishmania*, pirimidinas sintéticas, desenvolvimento de fármacos

ABSTRACT

Leishmaniasis, a neglected tropical disease (NTD) caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp., is transmitted by infected sand flies and is endemic in tropical and subtropical regions, especially in socioeconomically vulnerable regions. Currently available treatments have severe adverse effects, making it difficult for patients to adhere to pharmacotherapy. This study investigated the leishmanicidal activity of 14 new synthetic pyrimidines through *in vitro* assays with phagocytic cells and promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. The compounds were first evaluated for toxicity in *J774.A1* lineage macrophages, 8 of which, with lower cytotoxicity, were subsequently tested against *Leishmania* promastigotes using amphotericin B as a positive control. The data were processed in the Prisma® software to obtain statistical parameters, such as significance level and inhibitory concentration values for 50% (IC₅₀). The results indicate that the compounds IJS01 (IC₅₀ (μM): 7.09 ± 4.20), IJS04 (IC₅₀ (μM): 15.21 ± 2.43) and IJS07 (IC₅₀ (μM): 22.85 ± 0.88) in *L. chagasi* promastigotes and the compounds IJS02 (IC₅₀ (μM): 6.978 ± 1.70) and IJS07 (IC₅₀ (μM): 1.642 ± 0.98) in *L. amazonensis* may be promising for the development of new drugs against leishmaniasis as they present a considerable inhibitory effect at a low concentration in relation to the other compounds investigated.

Keywords: *Leishmania*, synthetic pyrimidines, drug development

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	Doenças Negligenciadas.....	10
2.2	Leishmaniose.....	11
2.3	Epidemiologia da Leishmaniose.....	14
2.4	Formas Evolutivas e Formas Clínicas.....	16
2.5	<i>Leishmania amazonensis</i>	17
2.6	Epidemiologia da <i>Leishmania amazonensis</i>	18
2.7	Sinais e Sintomas da <i>Leishmania amazonensis</i>	19
2.8	Tratamento contra <i>Leishmania amazonensis</i>	20
2.9	<i>Leishmania chagasi</i>	21
2.10	Epidemiologia da <i>Leishmania chagasi</i>	23
2.11	Sinais e Sintomas da <i>Leishmania chagasi</i>	24
2.12	Tratamento contra <i>Leishmania chagasi</i>	25
2.13	Limitações dos Tratamentos Atuais contra Leishmaniose e Casos de Resistência.....	26
2.14	Pirimidinas Sintéticas.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral:.....	30
3.1	Objetivos específicos:.....	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Seleção dos Compostos.....	31
4.2	Cultivo das Linhagens Celulares.....	32
4.3	Ensaio <i>in vitro</i> para Avaliação da Citotoxicidade dos Compostos.....	33
4.4	Realização de Ensaio <i>in vitro</i> para Avaliação da Atividade Anti-leishmania dos Compostos Sintéticos.....	35
4.5	Análise Estatística dos Dados.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada do mosquito infectado, pertencente ao gênero *Lutzomyia*. É uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN) mais prevalentes em todo o mundo, afetando principalmente populações carentes em regiões tropicais e subtropicais (OPAS, 2019), com distribuição endêmica em treze países da região das Américas, com uma média anual aproximada de 3.500 casos, sendo que 96% destes ocorrerem no Brasil (OPAS, 2022).

A leishmaniose é uma doença complexa e apresenta diversas formas clínicas, que variam de acordo com a espécie envolvida, a região geográfica e o sistema imunológico do hospedeiro. As formas mais comuns são a leishmaniose cutânea (*Leishmania amazonensis*), que é caracterizada por lesões na pele e mucosas, e a leishmaniose visceral (*Leishmania chagasi*), que afeta os órgãos internos e pode levar à morte se não tratada adequadamente.

O tratamento disponível atualmente para leishmaniose é baseado principalmente em medicamentos que apresentam limitações devido à alta citotoxicidade, que causam efeitos adversos severos e dificultam a adesão ao tratamento, além disso, possuem custos elevados, restrições na administração e dosagem dos mesmos, assim como a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelos parasitos. Os medicamentos tipicamente utilizados são anfotericina B, antimoniato de meglumina e pentamidina (Chakravarty, 2019). Dessa forma, pelas limitações dos medicamentos utilizados, se torna necessária e urgente a busca por outros compostos capazes de combater essa doença.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial leishmanicida de pirimidinas sintéticas como uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais para leishmaniose, investigando a eficácia dessas substâncias no combate às formas evolutivas de *Leishmania*, visando a descoberta de novos compostos terapêuticos. Além disso, pretende-se avaliar a citotoxicidade das pirimidinas frente a macrófagos *J774.A1*, investigar a atividade anti-leishmania contra *L. chagasi* e *L. amazonensis*, e identificar os compostos mais promissores para desenvolvimento futuro de fármacos mais seguros e eficazes contra essa doença complexa e prevalente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas

Doenças negligenciadas são um grupo de patologias que afetam predominantemente as populações mais pobres e marginalizadas do mundo, localizadas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Estas doenças, muitas vezes, recebem pouca atenção das comunidades científica e médica, bem como dos formuladores de políticas públicas e dos investidores financeiros, o que contribui para a perpetuação de ciclos de pobreza e doença. A negligência em termos de pesquisa e desenvolvimento de tratamentos efetivos e acessíveis resulta em um impacto desproporcionalmente elevado sobre as populações vulneráveis (Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, 2022). Entre as principais doenças negligenciadas estão:

- a) Dengue: Causada por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*, a dengue pode resultar em febre alta, dores musculares e articulares intensas, e, em casos graves, hemorragia e choque, que podem ser fatais.
- b) Hanseníase (Lepra): Uma infecção bacteriana crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele, os nervos periféricos, o trato respiratório superior e os olhos. A hanseníase pode levar a deformidades físicas e estigmatização social significativa.
- c) Doença de Chagas: Provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida principalmente por insetos triatomíneos, essa doença pode causar problemas cardíacos e digestivos severos, que podem ser fatais se não tratados.
- d) Esquistossomose: Causada por vermes trematódeos *Schistosoma mansoni*, esta doença é adquirida através do contato com água contaminada. Pode causar danos ao fígado, intestinos, pulmões e bexiga.
- e) Leishmanioses: Um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por flebotomíneos. As manifestações clínicas variam desde úlceras cutâneas até formas viscerais potencialmente fatais (OPAS, 2022).

Essas doenças negligenciadas impõem um enorme fardo socioeconômico nas comunidades afetadas. Muitas vezes, elas resultam em incapacidade crônica, perda de produtividade e custos elevados para o tratamento, exacerbando a pobreza e a marginalização

social. Em muitas regiões, a prevalência dessas doenças é tanto uma causa quanto uma consequência da pobreza. Elas afetam desproporcionalmente as populações que já enfrentam desafios significativos, como falta de acesso a serviços de saúde, saneamento inadequado, e educação limitada sobre prevenção e tratamento (DE CIÊNCIA, 2010).

O controle e tratamento das doenças negligenciadas enfrentam diversos desafios. Primeiramente, há uma escassez de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, principalmente devido ao baixo retorno financeiro esperado pelas indústrias farmacêuticas. Além disso, os tratamentos disponíveis muitas vezes são antigos, ineficazes, tóxicos e difíceis de administrar. A infraestrutura de saúde em muitas regiões endêmicas é inadequada, dificultando a distribuição e administração dos tratamentos. A resistência a medicamentos também está se tornando um problema crescente para várias dessas doenças (WHO, 2024).

Nos últimos anos, tem havido um esforço crescente por parte de organizações internacionais, governos e ONGs para enfrentar as doenças negligenciadas. Iniciativas como a Aliança Global para o Desenvolvimento de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) e o Programa de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) têm trabalhado para aumentar a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos, bem como melhorar a distribuição de medicamentos existentes. Políticas de saúde pública focadas em melhorar o saneamento, o acesso à água potável, a educação em saúde e a infraestrutura de saúde também são cruciais para o controle dessas doenças (Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, 2022).

Assim, as doenças negligenciadas representam um desafio significativo para a saúde pública global, especialmente nas regiões mais pobres do mundo. A falta de atenção e investimento em pesquisa e tratamento perpetua o ciclo de pobreza e doença, destacando a necessidade urgente de ações coordenadas e sustentáveis para enfrentar esses problemas. Aumentar a conscientização, melhorar as políticas de saúde e investir em novas tecnologias e tratamentos são passos essenciais para reduzir o impacto dessas doenças nas populações mais vulneráveis.

2.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa complexa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que abrange mais de 20 espécies patogênicas para humanos. Este gênero é responsável por um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde lesões

cutâneas autolimitadas até formas viscerais potencialmente fatais. A transmissão da leishmaniose ocorre predominantemente através da picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquitos-palha. Esses vetores são pequenos insetos hematófagos que se tornam infectados ao se alimentarem do sangue de hospedeiros vertebrados infectados com a forma amastigota do parasita, que se desenvolve no trato digestivo dos mosquitos e se transforma em promastigotas infectantes (CDC, 2024).

Figura 1. Informações sobre o mosquito-palha.



Fonte: FioCruz - Instituto Oswaldo Cruz, 2023

As formas clínicas da leishmaniose podem ser divididas em três categorias principais: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea, a forma mais comum, caracteriza-se por úlceras na pele que, embora geralmente não sejam fatais, podem causar desfigurações significativas e estigmatização social. A leishmaniose mucocutânea, por outro lado, afeta tanto a pele quanto as mucosas, particularmente do nariz, boca e garganta, podendo levar a deformidades severas e dificuldades respiratórias e de alimentação. A leishmaniose visceral, também conhecida como

calazar, é a forma mais grave da doença e afeta órgãos internos como o fígado, baço e medula óssea. Sem tratamento, a leishmaniose visceral pode ser fatal, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e crianças (Ameen, 2010).

A distribuição geográfica da leishmaniose é ampla, afetando populações em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, incluindo partes da África, Ásia, América Latina e até mesmo algumas áreas do sul da Europa. A ecologia da doença é complexa e está intimamente ligada às condições ambientais que favorecem a proliferação dos flebotomíneos, tais como a presença de matéria orgânica em decomposição e a umidade. Além disso, fatores socioeconômicos, como pobreza, desnutrição, migração e urbanização não planejada, contribuem significativamente para a vulnerabilidade das populações à infecção (Brasil, 2020).

O manejo da leishmaniose é desafiador devido à diversidade de espécies de *Leishmania* e suas diferentes respostas aos tratamentos. Os métodos de controle incluem a eliminação dos vetores através do uso de inseticidas, melhorias no saneamento e a promoção de medidas de proteção individual, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticida. No entanto, o tratamento da leishmaniose permanece um grande desafio, pois os medicamentos disponíveis, como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a miltefosina, podem ser tóxicos, caros e nem sempre acessíveis nas regiões mais afetadas (ARONSON et al, 2016).

Além das complexidades clínicas da leishmaniose, a resistência aos medicamentos emergiu como um desafio crítico na gestão eficaz da doença. A resistência aos tratamentos existentes tem crescido, complicando ainda mais o quadro de controle da leishmaniose e aumentando os custos e a carga sobre os sistemas de saúde em países endêmicos. Esta resistência é particularmente preocupante nos casos de leishmaniose visceral, onde a falha terapêutica pode ter consequências devastadoras, incluindo a morte do paciente. A resistência aos medicamentos antileishmaniais pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a exposição repetida e prolongada aos mesmos agentes terapêuticos, bem como a capacidade adaptativa do parasita em desenvolver mecanismos de evasão ou resistência aos efeitos dos medicamentos. Este cenário é agravado pela falta de novos medicamentos no pipeline de desenvolvimento, resultando em opções terapêuticas limitadas e sobrecarga dos tratamentos existentes (ARONSON et al, 2016).

Portanto, a necessidade urgente de desenvolver novos tratamentos e estratégias de controle é crucial para enfrentar os desafios crescentes impostos pela resistência aos medicamentos. A pesquisa contínua e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como

as pirimidinas sintéticas em investigação, oferecem esperança renovada na luta contra a leishmaniose. Essas novas moléculas têm mostrado potencial em superar os obstáculos associados aos tratamentos convencionais, oferecendo uma alternativa promissora que pode ser menos suscetível à resistência parasitária (Ameen, 2010).

Além do desenvolvimento de novos tratamentos, fortalecer os sistemas de saúde nos países endêmicos é essencial para melhorar o diagnóstico precoce e o manejo eficaz da doença. Isso inclui investimentos em infraestrutura laboratorial, capacitação de profissionais de saúde e implementação de programas de vigilância epidemiológica robustos. A detecção precoce da infecção e a intervenção terapêutica oportuna são fundamentais para reduzir a morbidade e mortalidade associadas à leishmaniose (OPAS, 2022).

2.3 Epidemiologia da Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença amplamente distribuída, endêmica em 98 países e territórios, afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais. As áreas mais afetadas incluem partes significativas da África, especialmente o leste e o nordeste, o subcontinente indiano, a região mediterrânea, a América Latina, e algumas partes do Oriente Médio. A prevalência da doença é influenciada por diversos fatores, incluindo condições ambientais, socioeconômicas e demográficas, que favorecem a proliferação dos vetores e a exposição das populações ao risco de infecção (Warusavithana et al., 2022).

Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas com *Leishmania* em todo o mundo, com cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas onde a doença é endêmica e, portanto, em risco de infecção. Essa ampla distribuição geográfica e o elevado número de pessoas em risco destacam a importância da leishmaniose como um problema de saúde pública global (Warusavithana et al., 2022).

Entre as diferentes formas clínicas da leishmaniose, a leishmaniose cutânea emerge como a mais prevalente, abrangendo a maioria dos casos diagnosticados ao redor do mundo. Caracterizada inicialmente por pequenas pápulas que evoluem para lesões ulceradas na pele, esta forma da doença pode variar em gravidade, desde lesões discretas até grandes úlceras que comprometem profundamente a integridade da pele. Embora raramente fatal, a leishmaniose cutânea pode deixar cicatrizes permanentes e desfigurantes, que não apenas impactam a estética física dos pacientes, mas também têm repercussões psicológicas e sociais significativas, contribuindo para o isolamento social e a estigmatização (Ameen, 2010).

Figura 2. Imagens de pacientes com leishmaniose cutânea.



Fonte: AMEEN, M., 2010

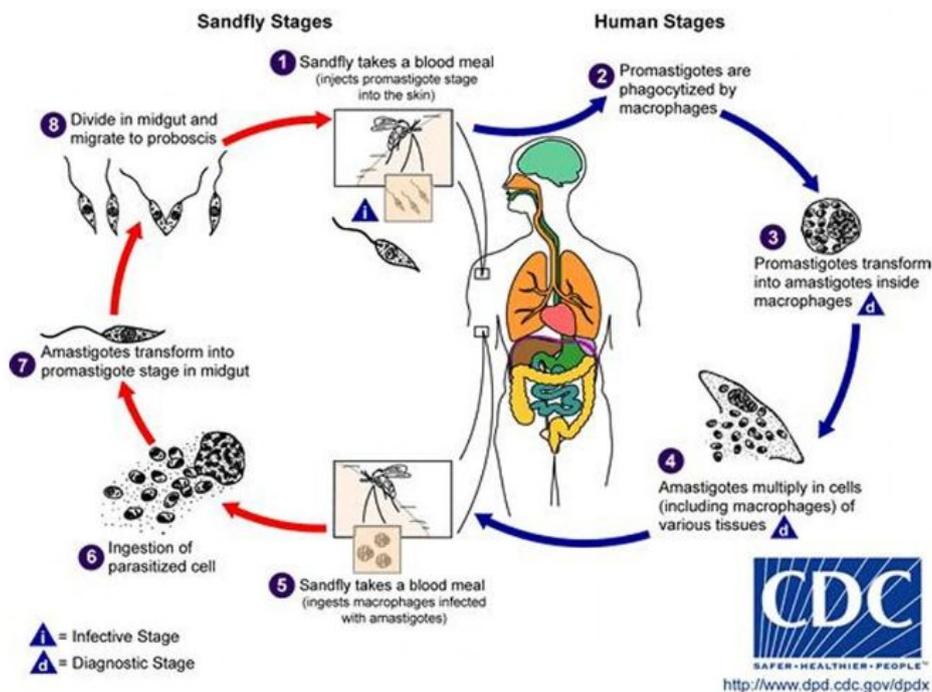
Por outro lado, a leishmaniose visceral, conhecida coloquialmente como calazar, representa a forma mais grave da doença. Esta condição insidiosa afeta principalmente órgãos internos vitais, incluindo o fígado, o baço e a medula óssea, apresentando um curso clínico progressivo e potencialmente fatal se não for tratada prontamente. Os sintomas típicos incluem febre prolongada, perda de peso inexplicável, anemia severa e hepatoesplenomegalia, onde o fígado e o baço aumentam de tamanho devido à infiltração do parasita (Neves et al., 2016). A complexidade desta forma da doença exige não apenas um diagnóstico precoce e preciso, mas também um manejo terapêutico agressivo para evitar complicações graves e a mortalidade associada.

A distinção entre leishmaniose cutânea e visceral não se limita apenas às suas manifestações clínicas distintas, mas também às abordagens terapêuticas necessárias para cada uma delas. Enquanto a leishmaniose cutânea pode responder bem a tratamentos tópicos e sistêmicos menos agressivos, como antimoniais pentavalentes e azólicos, a leishmaniose visceral requer terapias mais intensivas, como anfotericina B e a miltefosina, devido à natureza disseminada e potencialmente fatal da infecção (Chakravarty & Sundar, 2019). Em resumo, compreender as diferenças entre as formas cutânea e visceral da leishmaniose não apenas informa o diagnóstico e manejo clínico adequados, mas também destaca a importância de estratégias preventivas eficazes e do desenvolvimento contínuo de novas terapias para enfrentar os desafios complexos apresentados por esta doença negligenciada.

2.4 Formas Evolutivas e Formas Clínicas

O ciclo de vida do *Leishmania* é complexo e envolve dois principais estágios morfológicos: a forma promastigota e a forma amastigota. A forma promastigota, que possui um flagelo, é encontrada no trato digestivo dos flebotomíneos, os vetores da doença. Quando os mosquitos infectados picam um hospedeiro vertebrado, eles inoculam promastigotas na pele, que são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema imunológico do hospedeiro. Dentro dessas células, os promastigotas transformam-se em amastigotas, que são formas arredondadas sem flagelo. As amastigotas multiplicam-se dentro dos macrófagos e podem infectar outras células, perpetuando a infecção (Neves et al., 2016).

Figura 3. Ciclo de vida resumido da *Leishmania spp.*



Fonte: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), 2024.

A infecção por *Leishmania* pode resultar em diferentes manifestações clínicas, que são influenciadas de acordo com a espécie, pela resposta imunológica do hospedeiro e por fatores ambientais. As principais formas clínicas da leishmaniose incluem:

- Leishmaniose Cutânea: Caracterizada por úlceras na pele, que podem ser únicas ou múltiplas. As lesões cutâneas geralmente aparecem no local da picada do mosquito e podem variar em tamanho. Embora não sejam fatais, essas lesões podem causar desfiguração e cicatrizes permanentes, afetando a qualidade de vida dos pacientes.
- Leishmaniose Mucocutânea: Essa forma da doença afeta tanto a pele quanto as mucosas do nariz, boca e garganta. Pode resultar em destruição dos tecidos dessas áreas, levando a deformidades severas. A leishmaniose mucocutânea é particularmente prevalente na América Latina, sendo frequentemente causada por espécies como *Leishmania braziliensis*.

Figura 4. Aspecto clínico da leishmaniose mucocutânea.



Fonte: Santos, Marconi, 2013.

- Leishmaniose Visceral (Calazar): A forma visceral da leishmaniose é a mais grave e pode ser fatal se não tratada. Ela afeta órgãos internos como o fígado, baço e medula óssea. Os sintomas incluem febre persistente, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço) e fraqueza geral. Esta forma da doença é mais comum no subcontinente indiano, no leste da África e no Brasil (Neves et al., 2016).

A diversidade nas manifestações clínicas da leishmaniose, bem como sua ampla distribuição geográfica, torna o diagnóstico e o tratamento da doença desafiadores. A complexidade do ciclo de vida do parasita e a variedade de espécies envolvidas exigem abordagens específicas para o controle e manejo da doença em diferentes regiões endêmicas.

2.5 *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis é uma das várias espécies de *Leishmania* responsáveis por causar leishmaniose cutânea e mucocutânea na América Latina. Esta espécie é particularmente significativa na região amazônica, onde a transmissão ocorre predominantemente através da picada do flebotomíneo *Lutzomyia flaviscutellata*. Os mosquitos-palha do gênero *Lutzomyia* atuam como vetores ao se alimentar do sangue de hospedeiros infectados e, subsequentemente, inoculam os promastigotas metacíclicos infectantes na pele de novos hospedeiros vertebrados durante as picadas subsequentes (CDC, 2024).

A *Leishmania amazonensis* possui particularidades que a distinguem de outras espécies causadoras de leishmaniose. As infecções causadas por esta espécie podem resultar em uma ampla gama de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas localizadas até formas mucocutâneas mais graves. Além disso, estudos indicam que a resposta imunológica do hospedeiro pode variar significativamente, o que influencia a gravidade e a evolução da doença. Fatores ambientais e ecológicos, como a presença de reservatórios animais e as condições do habitat dos vetores, também desempenham um papel crucial na epidemiologia da doença (Brasil, 2006).

2.6 Epidemiologia da *Leishmania amazonensis*

A epidemiologia da *Leishmania amazonensis* está fortemente associada à região Amazônica, abrangendo países como Brasil, Bolívia, Peru e Colômbia. Esta área é caracterizada por sua vasta biodiversidade e ecossistemas complexos, que proporcionam um ambiente propício para a proliferação dos vetores e a manutenção de ciclos de transmissão zoonótica. No Brasil, a leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* representa um problema significativo de saúde pública, com milhares de casos registrados anualmente. A incidência da doença é especialmente alta em áreas rurais e periurbanas, onde as condições de vida muitas vezes favorecem o contato entre humanos, vetores e reservatórios animais (Ministério da Saúde, nota informativa nº 13/2020).

A disseminação da *L. amazonensis* está intimamente ligada a mudanças ambientais e atividades humanas, como desmatamento, urbanização e migração, que perturbam os habitats naturais e aumentam a exposição das populações humanas aos vetores. Além disso, a pobreza, a falta de infraestrutura sanitária adequada e o acesso limitado aos serviços de saúde contribuem para a vulnerabilidade das populações locais à infecção (ALEMAYEHU, 2017).

Os esforços de controle da leishmaniose cutânea na região Amazônica incluem estratégias de vigilância epidemiológica, controle de vetores, manejo ambiental e educação em saúde. A detecção precoce e o tratamento adequado dos casos são fundamentais para reduzir a morbidade associada à doença. No entanto, desafios persistem, como a resistência aos medicamentos e a necessidade de desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas e preventivas. A compreensão aprofundada da epidemiologia e da ecologia da *L. amazonensis* é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e manejo da leishmaniose cutânea na região (Brasil, 2006).

2.7 Sinais e Sintomas da *Leishmania amazonensis*

A infecção por *Leishmania amazonensis* manifesta-se principalmente através de lesões cutâneas que podem evoluir para úlceras persistentes. Essas lesões costumam aparecer no local da picada do flebotomíneo infectado, geralmente em áreas expostas do corpo, como pernas, braços e face. Inicialmente, a lesão pode se apresentar como uma pápula ou nódulo eritematoso que, com o tempo, se ulcera e pode se expandir em tamanho. As lesões são geralmente indolores, mas podem causar prurido e desconforto significativo, especialmente se houver infecção secundária por bactérias (Neves et al., 2016).

As úlceras cutâneas provocadas pela infecção de *Leishmania amazonensis* representam um desafio significativo para os pacientes, tanto em termos de saúde física quanto psicossocial. Estas lesões ulceradas são características distintivas da leishmaniose cutânea, persistindo por longos períodos se não forem tratadas adequadamente. Embora a cura espontânea seja possível em alguns casos, muitos pacientes enfrentam cicatrizes desfigurantes que não apenas comprometem a estética, mas também têm profundas repercussões psicológicas e sociais. A estigmatização e o isolamento social são comuns entre os pacientes que lutam com estas lesões visíveis, afetando negativamente sua qualidade de vida e bem-estar emocional (CDC, 2024).

Além das manifestações cutâneas, *L. amazonensis* pode causar formas mais graves da doença, como a leishmaniose mucocutânea, que representa uma ameaça adicional à saúde. Nesta forma avançada, a infecção se dissemina para as mucosas do nariz, boca e garganta, resultando em destruição progressiva dos tecidos. Esta condição não apenas causa deformidades severas, mas também pode levar a complicações respiratórias significativas devido à invasão dos tecidos mucosos. Embora menos comum do que a leishmaniose cutânea

simples, a forma mucocutânea da doença é clinicamente mais grave e requer intervenção médica imediata para prevenir danos irreparáveis (Neves et al., 2016).

A disseminação hematogênica do parasita, embora rara, é uma complicação adicional que pode ocorrer em casos avançados de leishmaniose cutânea. Esta disseminação pode resultar em múltiplas lesões pelo corpo, exacerbando ainda mais o sofrimento do paciente e aumentando a complexidade do tratamento necessário. A gestão eficaz da leishmaniose, portanto, requer não apenas terapias dirigidas à erradicação do parasita localizado, mas também estratégias de prevenção e monitoramento para evitar a disseminação sistêmica da infecção (ARONSON et al, 2016).

Assim, a leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis* apresenta um espectro variado de manifestações clínicas, desde úlceras cutâneas persistentes até formas mais graves como a leishmaniose mucocutânea e a disseminação hematogênica. A compreensão abrangente dessas manifestações é crucial para o manejo clínico eficaz da doença, com ênfase na intervenção precoce, tratamento adequado e suporte contínuo aos pacientes afetados.

2.8 Tratamento contra *Leishmania amazonensis*

O tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis* envolve principalmente o uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio. Esses medicamentos são considerados a primeira linha de tratamento e são administrados por via intramuscular ou intravenosa. Apesar de serem eficazes, os antimoniais apresentam várias limitações, incluindo toxicidade significativa, necessidade de longos cursos de tratamento e desenvolvimento de resistência em algumas áreas endêmicas (OPAS, 2022).

Para pacientes que não respondem aos antimoniais ou apresentam intolerância aos mesmos, existem alternativas terapêuticas. A anfotericina B, particularmente na forma lipossomal ou complexo lipídico de anfotericina B, é uma opção eficaz, especialmente para formas graves da doença, embora seu uso seja limitado pela necessidade de administração intravenosa e pelo perfil de toxicidade, que inclui nefrotoxicidade (Chakravarty & Sundar, 2019). Outra alternativa é a pentamidina, que pode ser utilizada em casos de resistência ou falha dos antimoniais, embora também esteja associada a efeitos adversos como hipoglicemia, hipotensão e toxicidade hepática.

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, desempenha um papel significativo no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral, sendo frequentemente administrada em

combinação com outros medicamentos para aumentar a eficácia terapêutica. Na forma cutânea da doença, a paromomicina tópica tem mostrado eficácia em certas regiões, especialmente onde é administrada diretamente sobre as lesões, contribuindo para a redução da carga parasitária local (ARONSON et al, 2016). No entanto, seu uso ainda enfrenta limitações consideráveis devido à disponibilidade irregular e aos custos relativamente elevados, o que restringe sua aplicação em larga escala em áreas endêmicas.

Além das terapias convencionais, a pesquisa atual está direcionada ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para melhorar o manejo da leishmaniose. Estudos recentes têm explorado novas drogas com diferentes mecanismos de ação, vacinas potenciais e estratégias de imunoterapia para combater a doença de forma mais eficaz e segura no futuro (Chakravarty & Sundar, 2019). A identificação de novos alvos moleculares nos parasitas, bem como a aplicação de terapias combinadas que visam múltiplos aspectos do ciclo de vida do *Leishmania*, representam áreas promissoras de pesquisa.

A diversificação das estratégias terapêuticas não apenas visa superar os desafios associados à resistência aos medicamentos e toxicidade dos tratamentos atuais, mas também busca oferecer opções mais acessíveis e adaptáveis aos contextos de saúde pública em países endêmicos. A abordagem integrada de desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, aliada à melhoria das práticas de controle e diagnóstico, é essencial para enfrentar os complexos desafios apresentados pela leishmaniose em nível global.

2.9 *Leishmania chagasi*

Leishmania chagasi, também conhecida como *Leishmania infantum*, é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas. A transmissão desta espécie ocorre através da picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, com *Lutzomyia longipalpis* sendo o vetor mais comum. Estes insetos, conhecidos popularmente como mosquitos-palha, são predominantes em áreas tropicais e subtropicais, onde encontram condições ambientais ideais para sua reprodução e sobrevivência. Quando os mosquitos infectados picam um hospedeiro vertebrado, eles inoculam promastigotas metacíclicas, que são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro. Dentro dos macrófagos, os parasitas se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar, perpetuando o ciclo de infecção (FIOCRUZ, 2023).

A *L. chagasi* possui características que a tornam especialmente virulenta e adaptada para infectar hospedeiros humanos e caninos, que são os principais reservatórios da doença nas áreas urbanas e periurbanas. Os cães, em particular, desempenham um papel crucial na

manutenção e disseminação da infecção, servindo como uma fonte constante de parasitas para os flebotômíneos vetores. A adaptação desta espécie à urbanização tem contribuído significativamente para a expansão da leishmaniose visceral em áreas metropolitanas, representando um desafio crescente para as autoridades de saúde pública (Brasil, 2006).

A *L. chagasi* demonstra uma capacidade notável de adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros. Nos hospedeiros humanos, a infecção pode levar a uma resposta imune inadequada, permitindo que os parasitas proliferem nos órgãos viscerais, como fígado, baço e medula óssea. Esta adaptação imunoevasiva é facilitada por mecanismos complexos que incluem a modulação de citocinas e a inibição da ativação de macrófagos. Esses mecanismos de evasão imunológica são essenciais para a sobrevivência prolongada do parasita dentro do hospedeiro e contribuem significativamente para a patogênese da leishmaniose visceral (ALEMAYEHU, 2017).

Nos cães, que são os principais reservatórios urbanos da *L. chagasi*, a infecção pode ser assintomática ou manifestar-se como doença clínica com sintomas semelhantes aos observados em humanos, incluindo esplenomegalia, febre e anemia. Os cães infectados desempenham um papel crucial na manutenção e disseminação da infecção. Eles servem como uma fonte contínua de parasitas para os flebotômíneos vetores, perpetuando o ciclo de transmissão. Estudos epidemiológicos demonstram que áreas com alta densidade de cães infectados correspondem a maiores taxas de infecção humana, evidenciando a importância dos reservatórios caninos no controle da doença (Brasil, 2006).

A urbanização tem um impacto significativo na epidemiologia da leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*. A expansão urbana, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, cria condições favoráveis para a proliferação dos flebotômíneos vetores e a manutenção dos reservatórios caninos. A urbanização desordenada muitas vezes resulta em ambientes propícios para os mosquitos, como áreas com acumulação de lixo, falta de saneamento básico e presença de animais domésticos e silvestres em proximidade com humanos. Estas condições facilitam a interação entre os vetores, os reservatórios e os hospedeiros humanos, aumentando a transmissão da doença (FIOCRUZ, 2023).

Em áreas metropolitanas, a leishmaniose visceral representa um desafio crescente para as autoridades de saúde pública. A integração dos programas de controle de zoonoses, que tradicionalmente focam em áreas rurais, com estratégias urbanas eficazes é crucial. Isto inclui a implementação de medidas como o controle de populações de mosquitos, a redução de habitats favoráveis para os vetores, a vigilância epidemiológica constante e a educação pública sobre medidas preventivas. A identificação e tratamento de cães infectados, bem

como a vacinação de animais domésticos onde disponível, também são componentes importantes das estratégias de controle da doença em áreas urbanas (OPAS, 2022).

O controle da leishmaniose visceral em ambientes urbanos enfrenta múltiplos desafios. A mobilidade populacional, a densidade elevada de moradores, e as barreiras econômicas e sociais para o acesso a cuidados de saúde complicam a implementação de programas de controle. Além disso, a resistência a tratamentos convencionais e a falta de novos medicamentos acessíveis agravam o problema. A necessidade de abordagens integradas que envolvam setores da saúde, meio ambiente e educação é evidente para enfrentar esta ameaça de saúde pública de forma eficaz.

A leishmaniose visceral causada por *L. chagasi* continua a ser uma doença devastadora em muitas partes das Américas, e o esforço contínuo para entender sua biologia, transmissão e controle é essencial para mitigar seu impacto.

2.10 Epidemiologia da *Leishmania chagasi*

A *Leishmania chagasi* está amplamente distribuída em várias regiões das Américas, incluindo o Brasil, Venezuela, Colômbia, além de outros países da América Central e do Sul. No Brasil, a leishmaniose visceral é endêmica em diversas regiões, com a maior incidência observada no Nordeste, mas casos também são relatados no Centro-Oeste, Sudeste e Norte do país. A disseminação geográfica da doença está associada a fatores como migração humana, urbanização e mudanças ambientais que favorecem a proliferação dos vetores (OPAS, 2019).

Estudos epidemiológicos indicam que a leishmaniose visceral causada por *L. chagasi* afeta principalmente populações vulneráveis, incluindo crianças, pessoas em condições de pobreza e indivíduos imunocomprometidos. A doença apresenta uma alta taxa de mortalidade se não for tratada, com estimativas de letalidade variando entre 10% e 20% em pacientes não tratados. Mesmo com tratamento, a taxa de mortalidade pode ser significativa, especialmente em regiões com acesso limitado a cuidados de saúde adequados e onde o diagnóstico precoce é difícil de ser alcançado (OPAS, 2022).

A transmissão da *L. chagasi*, também conhecida como *L. infantum*, é um processo complexo influenciado por diversos fatores ecológicos e sociais. A presença de reservatórios caninos nas áreas urbanas desempenha um papel crucial no ciclo de transmissão da doença, aumentando significativamente o risco de infecção para os seres humanos. Os cães são os principais hospedeiros reservatórios da *L. chagasi* nas áreas urbanas, onde a proximidade das

habitações humanas a ambientes naturais favorece a proliferação dos vetores responsáveis pela transmissão, geralmente flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (ALEMAYEHU, 2017).

A interação entre humanos, cães e vetores em ambientes urbanos cria um cenário propício para a perpetuação do ciclo de infecção. Os flebotomíneos infectados podem picar os cães reservatórios e, subsequentemente, transmitir o parasita para os humanos durante a alimentação sanguínea. A urbanização rápida e desordenada em muitas regiões endêmicas intensifica essa dinâmica, aumentando a exposição humana aos vetores infectados. Para mitigar a propagação da leishmaniose visceral, são implementados programas de controle que abrangem diversas estratégias integradas. A vigilância epidemiológica é fundamental para monitorar a prevalência da doença e identificar novos focos de transmissão. O controle de vetores visa reduzir a população de flebotomíneos por meio de medidas como o uso de inseticidas e a melhoria do saneamento ambiental. Além disso, a identificação precoce e o tratamento adequado dos casos humanos são essenciais para interromper a cadeia de transmissão.

A gestão dos reservatórios caninos também desempenha um papel crucial nos esforços de controle. Estratégias incluem a realização de campanhas de conscientização e vacinação de cães, além do tratamento antiparasitário para reduzir a carga parasitária nos animais infectados. No entanto, a eficácia dessas medidas frequentemente enfrenta desafios operacionais significativos, como a falta de recursos financeiros e infraestrutura adequada nos sistemas de saúde locais (OPAS, 2019).

Assim, a complexidade da transmissão da *L. chagasi* requer uma abordagem integrada e sustentada para o controle eficaz da leishmaniose visceral. A colaboração entre governos, organizações não governamentais e comunidades locais é essencial para superar os desafios operacionais e fortalecer as estratégias de controle da doença em áreas endêmicas

2.11 Sinais e Sintomas da *Leishmania chagasi*

Os sinais e sintomas da leishmaniose visceral causada por *Leishmania chagasi* são graves e muitas vezes debilitantes. A doença geralmente começa com febre prolongada, que pode ser intermitente ou contínua e dura várias semanas ou meses. A febre é acompanhada por uma perda de peso significativa, que pode levar à caquexia. A anemia é outro sintoma comum, resultando de múltiplos fatores, incluindo hemólise, supressão da medula óssea e desnutrição (Neves et al., 2016).

A esplenomegalia (aumento do baço) é uma das características mais marcantes da leishmaniose visceral. O baço pode se tornar maciçamente aumentado, o que pode ser palpado durante o exame físico. A hepatomegalia (aumento do fígado) também é comum e pode estar associada à disfunção hepática. Outros sintomas incluem linfadenopatia (aumento dos linfonodos), fraqueza generalizada e uma aparência doente geral. Em crianças, a desnutrição severa é uma complicação frequente e pode agravar ainda mais a condição clínica (Neves et al., 2016).

Sem tratamento, a leishmaniose visceral é quase sempre fatal, geralmente dentro de dois anos após o início dos sintomas. A morte é geralmente causada por complicações associadas, como infecções bacterianas secundárias, sangramentos ou insuficiência orgânica múltipla. Indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles com HIV/AIDS, estão em maior risco de desenvolver formas mais graves e recorrentes da doença, e podem apresentar uma resposta terapêutica pobre (OPAS, 2022).

2.12 Tratamento contra *Leishmania chagasi*

O tratamento da leishmaniose visceral causada por *Leishmania chagasi* envolve uma variedade de medicamentos, cada um com suas próprias vantagens e limitações. Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, foram por muito tempo o tratamento padrão. Estes compostos são administrados por via intramuscular ou intravenosa e atuam interferindo na bioquímica do parasita. No entanto, a toxicidade significativa, incluindo cardiotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade, limita seu uso, especialmente em pacientes com comorbidades ou em áreas com alta resistência parasitária (SANGENITO et al, 2019).

A anfotericina B, especialmente em sua formulação lipossomal, emergiu como uma alternativa eficaz. A anfotericina B lipossomal é preferida devido ao seu perfil de toxicidade mais favorável em comparação com a formulação convencional (desoxicolato de anfotericina B), embora ainda possa causar nefrotoxicidade e reações infusionais. A administração intravenosa requer hospitalização, o que representa uma barreira significativa em áreas endêmicas com recursos limitados. Além disso, o custo elevado da anfotericina B lipossomal restringe seu uso em muitos países em desenvolvimento, onde a carga da leishmaniose visceral é mais pesada (Chakravarty & Sundar, 2019).

A miltefosina, um agente antileishmanial oral, oferece a vantagem da administração fácil, aumentando a adesão ao tratamento. A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como

um agente antineoplásico, mas demonstrou eficácia contra *Leishmania*. Embora menos tóxica que os antimoniais, a miltefosina ainda pode causar efeitos adversos como náuseas, vômitos e nefrotoxicidade. O uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de resistência, o que é uma preocupação crescente em áreas endêmicas (Ministério da Saúde, nota informativa 13/2020).

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, também é utilizada no tratamento da leishmaniose visceral. Administrada por via intramuscular, a paromomicina é eficaz, mas sua utilização é limitada por efeitos colaterais como ototoxicidade e nefrotoxicidade. A combinação de paromomicina com outros medicamentos, como a miltefosina, tem sido explorada para aumentar a eficácia e reduzir a duração do tratamento (ARONSON et al, 2016).

Além desses tratamentos, há um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de novas terapias para a leishmaniose visceral. A busca por novos compostos com melhores perfis de segurança e eficácia, bem como a exploração de abordagens de tratamento combinadas, são áreas de intensa investigação. O desenvolvimento de vacinas também está sendo explorado como uma estratégia preventiva a longo prazo. No entanto, a introdução de novas terapias enfrenta desafios significativos, incluindo os altos custos de desenvolvimento, a necessidade de ensaios clínicos rigorosos e a complexidade de implementar novas intervenções em regiões endêmicas (Chakravarty & Sundar, 2019).

2.13 Limitações dos Tratamentos Atuais contra Leishmaniose e Casos de Resistência

Os tratamentos atuais para a leishmaniose enfrentam várias limitações que complicam o controle e a gestão eficaz da doença. A toxicidade dos medicamentos é uma preocupação significativa. Os antimoniais pentavalentes, por exemplo, podem causar efeitos adversos graves, incluindo cardiotoxicidade e toxicidade hepática. A anfotericina B, apesar de ser eficaz, está associada a nefrotoxicidade e requer administração intravenosa, o que limita seu uso em áreas rurais e com recursos limitados. Enquanto isso, a miltefosina, apesar de facilitar a adesão dos pacientes por ser um medicamento de uso oral, possui efeitos teratogênicos comprovados, exigindo o uso de no mínimo dois métodos contraceptivos para indivíduos em idade fértil e a assinatura do Termo de Responsabilidade (Ministério da Saúde, nota informativa 13/2020).

O longo curso de tratamento é outra barreira significativa. Muitos dos medicamentos exigem regimes de tratamento prolongados, que podem variar de semanas a meses. Este fator não só afeta a adesão ao tratamento por parte dos pacientes, mas também aumenta o risco de

desenvolvimento de resistência devido ao uso inadequado ou interrompido dos medicamentos. A necessidade de administração parenteral para muitos desses medicamentos também representa um desafio, pois requer infraestrutura de saúde adequada e pessoal treinado, o que muitas vezes está ausente em áreas endêmicas (Ameen, 2010).

A resistência aos medicamentos é um problema crescente que ameaça a eficácia dos tratamentos disponíveis. A resistência aos antimoniais pentavalentes tem sido relatada em várias regiões endêmicas, resultando em falhas terapêuticas e necessidade de alternativas mais caras e menos acessíveis. A resistência à miltefosina também está emergindo como uma preocupação, especialmente dado seu uso crescente como tratamento oral de primeira linha. A combinação de terapias e o desenvolvimento de novos medicamentos são essenciais para superar este desafio, mas exigem investimento significativo em pesquisa e desenvolvimento (SANGENITO et al, 2019).

A falta de acesso a diagnósticos precoces e precisos também contribui para as limitações do tratamento. Em muitas áreas endêmicas, a infraestrutura de saúde é inadequada, e os métodos de diagnóstico são limitados, levando a atrasos no início do tratamento e, conseqüentemente, piores resultados clínicos. Além disso, a falta de conscientização sobre a doença entre as populações afetadas pode resultar em subnotificação e tratamento inadequado (ALEMAYEHU, 2017).

Finalmente, o custo elevado dos tratamentos, especialmente das formulações lipossomais de anfotericina B e novas drogas como a miltefosina, limita a disponibilidade desses medicamentos em regiões de baixa renda. A dependência de programas de doação e subsídios para fornecer esses tratamentos cria uma vulnerabilidade adicional, já que mudanças nas políticas de financiamento podem impactar a disponibilidade de medicamentos essenciais.

Para abordar essas limitações, é crucial um enfoque multifacetado que inclua o fortalecimento dos sistemas de saúde, a melhoria do acesso a diagnósticos e tratamentos, a promoção de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos e a implementação de estratégias eficazes de controle de vetores e manejo ambiental (Ameen, 2010).

2.14 Pirimidinas Sintéticas

Diante das limitações dos tratamentos atuais, a pesquisa sobre novas opções terapêuticas é crucial. As pirimidinas sintéticas têm mostrado potencial como agentes antileishmania, devido às suas propriedades farmacológicas e capacidade de modular processos biológicos essenciais nos parasitas. Este estudo visa avaliar a eficácia biológica de

novas pirimidinas sintéticas contra *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, buscando alternativas mais seguras e eficazes para o tratamento da leishmaniose (Boutaleb-Charki et al., 2009; Lachhab et al., 2022).

Os tratamentos existentes, embora eficazes em muitos casos, apresentam problemas significativos relacionados à toxicidade, custo elevado, resistência parasitária e dificuldades na administração. Estes desafios tornam imperativo o desenvolvimento de medicamentos que sejam mais seguros, acessíveis e eficazes. Entre as abordagens promissoras, as pirimidinas sintéticas emergem como potenciais agentes terapêuticos contra a leishmaniose.

As pirimidinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio que desempenham papéis cruciais em vários processos biológicos, incluindo a composição de ácidos nucleicos e metabolismo celular. A modificação sintética de pirimidinas tem permitido a criação de derivados com propriedades farmacológicas aprimoradas. Estes derivados têm demonstrado atividade significativa contra uma variedade de patógenos, incluindo os protozoários causadores da leishmaniose (Boutaleb-Charki et al., 2009).

Estudos iniciais sugerem que as pirimidinas sintéticas podem interferir em processos biológicos essenciais nos parasitas do gênero *Leishmania*. Estas moléculas podem inibir a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, comprometendo a capacidade do parasita de replicar e sobreviver. Além disso, as pirimidinas podem modular vias metabólicas críticas e interagir com alvos moleculares específicos no parasita, aumentando a eficácia do tratamento (Lachhab et al., 2022).

Um dos principais benefícios das pirimidinas sintéticas é sua potencial menor toxicidade em comparação com os tratamentos tradicionais, como os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B. A modificação estrutural dessas moléculas pode ser ajustada para aumentar a seletividade para os parasitas do gênero *Leishmania*, minimizando os efeitos adversos nos hospedeiros humanos. Isso é particularmente importante em pacientes com comorbidades ou aqueles que já experimentam os efeitos debilitantes da leishmaniose (Lachhab et al., 2022).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia biológica de novas pirimidinas sintéticas contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*. A *L. amazonensis* é conhecida por causar formas cutâneas e mucocutâneas da doença, enquanto *L. chagasi* é responsável pela leishmaniose visceral, uma forma mais grave e potencialmente fatal da infecção. Avaliar a eficácia destas novas moléculas contra ambas as espécies permitirá um entendimento abrangente de seu potencial terapêutico.

Além da eficácia antiparasitária, este estudo também se concentrou na segurança e toxicidade das pirimidinas sintéticas. Ensaio *in vitro* foram conduzidos para determinar a toxicidade em células humanas, garantindo que os compostos sejam seguros para uso clínico. A avaliação da citotoxicidade é crucial para o desenvolvimento de qualquer novo medicamento, especialmente para doenças como a leishmaniose, onde os pacientes muitas vezes já estão debilitados (SANGENITO et al, 2019).

O sucesso na identificação de pirimidinas sintéticas eficazes e seguras poderia revolucionar o tratamento da leishmaniose. Estes novos compostos podem oferecer uma alternativa valiosa aos medicamentos atuais, melhorando os resultados clínicos e reduzindo os efeitos adversos associados ao tratamento. Além disso, o desenvolvimento de tais terapias pode reduzir os custos e a complexidade do tratamento, tornando-o mais acessível para populações em áreas endêmicas com recursos limitados.

A pesquisa sobre pirimidinas sintéticas também abre portas para o desenvolvimento de outras classes de compostos antiparasitários. A compreensão dos mecanismos de ação dessas moléculas pode informar o design de novos fármacos direcionados a diferentes alvos moleculares no parasita, ampliando as opções terapêuticas disponíveis. Esta abordagem integrada de pesquisa e desenvolvimento é essencial para enfrentar o desafio da resistência aos medicamentos e garantir que os avanços no tratamento da leishmaniose possam ser sustentáveis a longo prazo (Boutaleb-Charki et al., 2009).

Assim, as pirimidinas sintéticas representam uma promissora linha de investigação na busca por tratamentos mais eficazes e seguros para a leishmaniose. Este estudo contribuiu significativamente para o entendimento de seu potencial terapêutico, estabelecendo bases sólidas para futuras pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito leishmanicida de pirimidinas sintéticas visando a descoberta de novas substâncias ativas contra a doença leishmaniose.

3.1 Objetivos específicos:

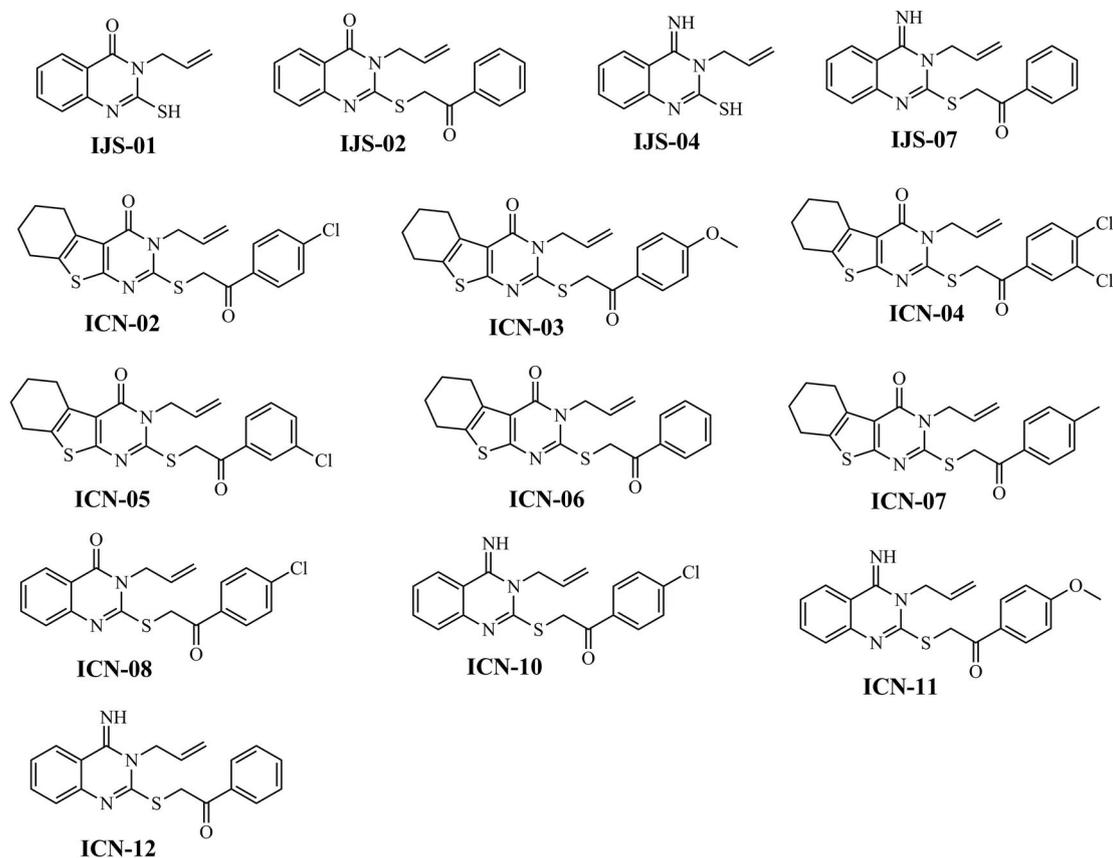
- a) Avaliar a citotoxicidade das pirimidinas sintetizadas frente a macrófagos *J774.A1* em ensaios de MTT;
- b) Investigar a atividade leishmanicida das pirimidinas sintéticas frente a formas evolutivas de *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis*;
- c) Identificar os compostos mais promissores para desenvolvimento futuro de fármacos.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção dos Compostos

As 14 pirimidinas sintetizadas passaram pelos processos de verificação de suas estruturas moleculares por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e do grau de pureza pelo equipamento HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), sendo aceitos apenas compostos com percentual igual ou maior que 95% de pureza. Posteriormente, foram pesados e diluídos com DMSO (dimetilsulfóxido), de modo a obter um estoque com concentração padrão de 50 mM para utilização nos testes biológicos.

Figura 5. Compostos utilizados na pesquisa.



Fonte: Autora, 2024.

4.2 Cultivo das Linhagens Celulares

Macrófagos de linhagem *J774.A1* foram mantidos em garrafas de cultura de 10 mL com meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino, em estufa a 36 °C e com atmosfera de 5% de CO₂. No momento de sua utilização, ao ser verificado o crescimento adequado, foi feita a contagem com câmara de Neubauer e ajustadas de modo que tenham 2,5×10⁴ células/poço, em que 100 µL/poço foram distribuídos em placas de 96 poços para os primeiros ensaios. Concomitantemente, formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram cultivadas em garrafas de cultura de 5 mL contendo meio Schneider, suplementado com soro fetal bovino, em estufa própria a 27 °C.

Figura 6. Fotografia de *Leishmania amazonensis* em garrafa de cultura vista pelo microscópio invertido.



Fonte: Autora, 2024.

4.3 Ensaios *in vitro* para Avaliação da Citotoxicidade dos Compostos

Utilizando-se as placas de cultura com 96 poços preparadas com os macrófagos foram iniciados os ensaios colorimétricos de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MONSMANN et al., 1983). Após a confirmação da aderência das células no fundo dos poços, o meio foi retirado e, em triplicata, 100 µL dos 14 diferentes compostos foram adicionados em diferentes concentrações (100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 µg/mL). Os grupos controles em cada placa foram obtidos adicionando-se o meio RPMI com suplementação de soro fetal bovino (10%), em outro o mesmo meio com DMSO a 0,2% (composto diluente das substâncias) e outro grupo sendo o medicamento controle (Anfotericina B e Pentamidina). Após 48h foi feita a leitura através do ensaio colorimétrico de redução do MTT, consistindo na retirada do tratamento anteriormente colocado, adição de

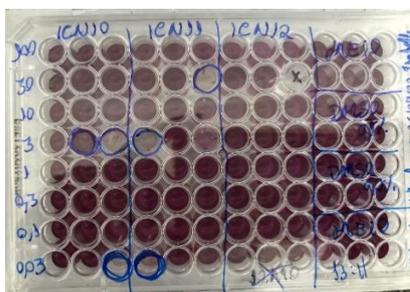
100 µL do composto do ensaio a ser metabolizado pelas células ainda vivas, incubação por 1h na estufa e, por fim, leitura da quantidade formada de cristais de formazan pelo Espectrofotômetro.

Para detalhar os procedimentos de leitura dos ensaios colorimétricos de MTT utilizados no estudo, destacam-se os seguintes aspectos:

1. Máquina Utilizada: Para a leitura das placas de cultura com 96 poços após o ensaio de MTT, foi utilizada uma máquina espectrofotométrica adequada para medições em microplacas. Máquinas comuns para este fim incluem espectrofotômetros de leitura de microplacas, que são capazes de medir a absorbância em múltiplos poços simultaneamente.
2. Procedimento de Leitura: Após a incubação das células com os compostos por 48 horas, o meio de cultura foi removido e substituído pelo composto de ensaio contendo MTT. O MTT é metabolizado pelas células vivas para formar cristais de formazan, cuja quantidade é proporcional à viabilidade celular. Após 1 hora de incubação na estufa para permitir a reação do MTT, as placas foram retiradas e a leitura foi realizada.
3. Método de Leitura da Absorbância: A leitura da absorbância foi feita em um comprimento de onda específico adequado para o MTT, em torno de 570 nm com uma leitura de referência em torno de 630 nm para corrigir quaisquer variações de fundo. Este comprimento de onda é escolhido para maximizar a detecção da intensidade da cor gerada pelo formazan, permitindo uma medida precisa da viabilidade celular.
4. Intensidade da Cor Gerada: A intensidade da cor gerada está diretamente relacionada à quantidade de células metabolicamente ativas presentes em cada poço. Células mais viáveis metabolizarão mais MTT, resultando em uma maior formação de formazan e, conseqüentemente, em uma absorbância mais alta medida pelo espectrofotômetro.
5. Controles Utilizados: Como mencionado, foram utilizados controles adequados, incluindo um grupo de controle negativo (meio de cultura RPMI com soro fetal bovino), um controle de solvente (meio com DMSO a 0,2%, usado como diluente dos compostos), e controles positivos (Anfotericina B e Pentamidina, medicamentos padrão conhecidos por sua atividade contra *Leishmania*).
6. Esses detalhes são essenciais para assegurar a validade e a precisão dos resultados obtidos nos ensaios colorimétricos de MTT, garantindo que os efeitos dos compostos

testados contra *Leishmania* sejam corretamente avaliados em condições controladas e padronizadas.

Figura 7. Exemplar de placa de ensaio MTT



Fonte: Autora, 2024.

4.4 Realização de Ensaio *in vitro* para Avaliação da Atividade Leishmanicida dos Compostos Sintéticos

Após detectado o devido crescimento dos parasitos nas garrafas de cultura, uma contagem foi realizada, assim como uma diluição dos mesmos em meio Schneider de forma que sejam distribuídas um total de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços contendo 100 μL de tal diluição e 100 μL dos 8 compostos em que foi atestado a sua baixa citotoxicidade em macrófagos, possuindo um CC_{50} maior que 100 μM . Tais compostos foram testados também em diferentes concentrações (100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$), assim como grupos controles contendo a diluição dos parasitos e 100 μL de meio, DMSO e com medicamentos controle. Após 48h, foi feita a contagem das células promastigotas de cada poço de forma manual, utilizando câmara de Neubauer e microscópio.

4.5 Análise Estatística dos Dados

O software GraphPad Prism[®] versão 8 foi utilizado para tratar os dados obtidos tanto nos testes de citotoxicidade, quanto nos ensaios com as formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania* usadas nesse estudo. Os valores de absorbância foram dispostos em tabelas para o cálculo da inibição dose-resposta, resultando nos valores de CI_{50} e do efeito máximo de cada substância, incluindo o grupo controle, acrescentando também a análise de significância por placa em relação ao grupo controle com DMSO. O mesmo procedimento ocorreu com os valores encontrados na contagem manual dos parasitos pós-tratamento. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ e expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os testes colorimétricos usando o sal de MTT em macrófagos de linhagem *J774.A1*, observou-se que 6 das 14 pirimidinas sintéticas apresentaram níveis elevados de citotoxicidade. Esses compostos foram excluídos da análise subsequente, focando-se nos 8 restantes que demonstraram um CI_{50} maior que 100 μ M (Tabela 1): IJS_01, IJS_02, IJS_04, IJS_7, ICN_08, ICN_10, ICN_11 e ICN_12. Esses resultados são particularmente relevantes, pois a não indução de citotoxicidade é crucial para novos fármacos leishmanicidas, dado que os tratamentos atuais são conhecidos por sua alta toxicidade e frequentes efeitos adversos.

Hipoteticamente, diferenças na estrutura molecular podem influenciar a interação dos compostos com células hospedeiras, como os macrófagos, ou com o parasita do gênero *Leishmania*. Por exemplo, grupos funcionais específicos ou modificações na estrutura da pirimidina podem afetar a capacidade do composto de se ligar a alvos celulares essenciais ou de interferir em processos metabólicos específicos do parasita, sem causar danos significativos às células hospedeiras.

Estudos anteriores têm destacado a importância de características estruturais na determinação da atividade biológica e da toxicidade de compostos sintéticos contra *Leishmania*. Compostos que mantêm uma estrutura molecular que favorece a seletividade para o parasita, minimizando o impacto nas células hospedeiras, tendem a ser mais promissores como candidatos a fármacos. Essas observações reforçam a necessidade de abordagens de design de fármacos que priorizem a segurança e a eficácia, além de evidenciar a importância dos testes preliminares de citotoxicidade como parte integrante da triagem inicial de novos compostos (Boutaleb-Charki et al., 2009; Lachhab et al., 2022).

Essa abordagem estrutural e a análise crítica dos dados experimentais são fundamentais para orientar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para leishmaniose, buscando reduzir os efeitos adversos associados aos tratamentos existentes e melhorar os resultados clínicos para os pacientes.

Tabela 1 - Dados de MTT para os compostos testados.

Composto	CC ₅₀ (μM) ^a	Efeito máximo (±DP) ^b
Anfotericina	60,60 ± 8,42	78,85 ± 1,57****
Pentamidina	13,93 ± 7,95	71,30 ± 3,54****
IJS01	>100	39,17 ± 3,19*
IJS02	>100	27,21 ± 2,23*
ICN08	>100	19,82 ± 2,03*
IJS04	>100	35,51 ± 6,58*
IJS07	>100	38,05 ± 5,66*
ICN10	>100	21,32 ± 3,58*
ICN11	>100	39,35 ± 5,96**
ICN12	>100	43,93 ± 8,07*
ICN02	>100	91,69 ± 0,39****
ICN03	24,86 ± 4,94	88,29 ± 4,97****
ICN04	46,10 ± 0,87	91,63 ± 0,70****
ICN05	11,82 ± 7,65	60,99 ± 7,04****
ICN06	10,40 ± 5,05	64,62 ± 6,45****
ICN07	20,14 ± 8,14	60,12 ± 2,59****

Fonte: Autora, 2024.

^aConcentração citotóxica para 50% (CC₅₀) calculada a partir da curva concentração-efeito

^bMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata.

Nos ensaios para avaliação da atividade anti-leishmania das pirimidinas sintéticas em *L. amazonensis* e *L. chagasi*, a Anfotericina B apresentou efeito citotóxico máximo de 100% (na concentração testada de 30 μM) em ambas as espécies de *Leishmania* (Tabelas 2 e 3). Por outro lado, os compostos sintetizados IJS_01, IJS_02, IJS_04, IJS_07 e ICN_08 tiveram como CI₅₀ em promastigotas de *L. chagasi* os valores 7,09 (± 4,20), 92,32 (± 4,05), 15,21 (± 2,43), 22,85 (± 0,88) e 65,56 (± 0,92) μM, respectivamente (Tabela 2). Já frente às promastigotas de *L. amazonensis*, as pirimidinas IJS-01, IJS-04 e ICN-11 não induziram citotoxicidade até a máxima concentração testada (100 μg/mL) (Tabela 3).

Tabela 2 - Efeito leishmanicida em promastigotas de *Leishmania chagasi*.

Composto	CI ₅₀ (μM) ^a	Efeito máximo (±DP) ^b
Anfotericina	0,02 ± 0,00	100 ± 0,00****
IJS01	7,09 ± 4,20	70,65 ± 4,20****
IJS02	92,32 ± 4,05	84,10 ± 7,01****
ICN08	65,56 ± 0,92	99,08 ± 1,59***
IJS04	15,21 ± 2,43	74,32 ± 4,20****
IJS07	22,85 ± 0,88	95,58 ± 1,53***
ICN10	ND	90,28 ± 4,05****
ICN11	ND	83,22 ± 4,05****
ICN12	ND	97,25 ± 4,77****

Fonte: Autora, 2024.

^aConcentração inibitória para 50% (CI₅₀) calculada a partir da curva concentração-efeito

^bMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata.

Tabela 3 - Efeito leishmanicida em promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Tratamento	CI ₅₀ (μM) ^a	Efeito máximo (±DP) ^b
Anfotericina	0,02 ± 0,00	100 ± 0,00****
IJS01	>100	32,89 ± 15,12****
IJS02	6,978 ± 1,70	82,35 ± 2,94****
ICN08	ND	100 ± 0****
IJS04	>100	6,32 ± 9,69****
IJS07	1,642 ± 0,98	99,02 ± 1,70****
ICN10	ND	91,18 ± 2,94****
ICN11	>100	30,39 ± 13,26***
ICN12	ND	93,00 ± 8,73****

Fonte: Autora, 2024.

^aconcentração inibitória 50 (CI₅₀) calculada a partir da curva concentração-efeito

^bMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicata.

6. CONCLUSÃO

O estudo realizado proporcionou dados importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para leishmaniose, focando na avaliação de pirimidinas sintéticas quanto à sua atividade leishmanicida e potencial toxicidade. A partir dos ensaios utilizando o sal de MTT em macrófagos da linhagem *J774.A1*, identificamos que alguns compostos apresentaram níveis elevados de citotoxicidade, o que os excluiu da análise subsequente. No entanto, oito compostos demonstraram ser promissores, exibindo um CC_{50} superior a 100 μ M e não induzindo citotoxicidade significativa nas concentrações testadas.

A análise estrutural desses compostos sugere que suas características moleculares podem influenciar sua interação com células hospedeiras e com o parasita *Leishmania*. Hipoteticamente, modificações na estrutura química das pirimidinas podem afetar sua seletividade, permitindo que atuem de maneira eficaz contra o parasita enquanto minimizam danos às células hospedeiras. Esse aspecto é crucial, considerando os altos índices de toxicidade e os efeitos adversos associados aos tratamentos atuais para leishmaniose.

Estudos anteriores têm destacado a importância do design molecular na determinação da atividade biológica e da segurança de compostos sintéticos contra *Leishmania*. Compostos que mantêm uma estrutura molecular favorável à seletividade para o parasita são promissores como candidatos a fármacos, destacando a necessidade contínua de estratégias de desenvolvimento de fármacos que priorizem a eficácia e a segurança (Lachhab et al., 2022).

Adicionalmente, os resultados obtidos reforçam a importância dos testes preliminares de citotoxicidade como parte essencial da triagem inicial de novos compostos, proporcionando uma base sólida para o avanço de candidatos promissores para ensaios pré-clínicos e clínicos. A combinação de abordagens estruturais e experimentais é crucial para orientar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra a leishmaniose, buscando melhorar os resultados clínicos e reduzir os impactos adversos nos pacientes.

REFERÊNCIAS

ALEMAYEHU ,B; Alemayehu, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, No.4. p.1, 2017.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13/2020 - CGZV/DEIDT/SVS/MS: Nota informativa miltefosina. Brasília, 2020

BOUTALEB-CHARKI, Samira et al. Copper (II) complexes of [1, 2, 4] triazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives as potential anti-parasitic agents. **Drug Metabolism Letters**, v. 3, n. 1, p. 35-44, 2009.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia de Bolso Leishmaniose Visceral. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária – 1. ed., – Brasília - DF: CFMV, 194 p.: il., 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília-DF, 2006.

Centers for Disease, Control and Prevention - CDC. Leishmaniasis, 05 de junho de 2024. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CHERUKUPALLI, Srinivasulu et al. An appraisal on synthetic and pharmaceutical perspectives of pyrazolo [4, 3-d] pyrimidine scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 309-339, 2018.

DE CIÊNCIA, Departamento et al. Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health. **Revista de saude publica**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz. Cientistas Decodificam Genoma Completo de Duas Espécies de Vetores de Leishmanioses. 10 de julho de 2023. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/cientistas-decodificam-genoma-completo-de-duas-especies-de-vetores-de-leishmanioses>>

LACHHAB, Saida et al. Synthesis of new 3-acetyl-1, 3, 4-oxadiazolines combined with pyrimidines as antileishmanial and antiviral agents. **Molecular Diversity**, p. 1-13, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55– 63, 1983.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. 13a edição. **Rio de Janeiro: Livraria Atheneu**, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. **Washington, D.C.**, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.37774/9789275725030>>.

Organización Panamericana de la Salud - OPAS. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPAS, 2019.

SANGENITO, Leandro S. et al. Leishmaniasis and Chagas disease–neglected tropical diseases: treatment updates. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 174-177, 2019.

SANTOS, Marconi Eduardo Sousa Maciel et al. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 13, n. 2, p. 15-21, 2013.

WARUSAVITHANA, Supriya et al. Review of the neglected tropical diseases programme implementation during 2012–2019 in the WHO-Eastern Mediterranean Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global report on neglected tropical diseases 2024**. World Health Organization, 2024.