



ISSN: 2595-1661

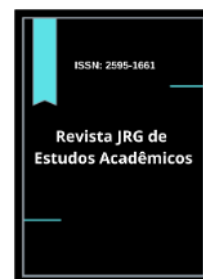
ARTIGO

Listas de conteúdos disponíveis em [Portal de Periódicos CAPES](https://portaldeperiodicos.capes.gov.br/)

Revista JRG de Estudos Acadêmicos

Página da revista:

<https://revistajrg.com/index.php/jrg>



Mecanismos Moleculares de Resistência Medicamentosa em Leishmania e suas Implicações para a Terapêutica

Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Leishmania and their Implications for Therapy

DOI: 10.55892/jrg.v8i19.2573

ARK: 57118/JRG.v8i19.2573

Recebido: 26/10/2025 | Aceito: 10/11/2025 | Publicado on-line: 23/11/2025

Ircila Margareth Sales Vasconcelos¹

<https://orcid.org/0009-0000-3778-7976>

<http://lattes.cnpq.br/9528135683828567>

Centro Universitário Unibra, PE, Brasil

E-mail: ircillasales@gmail.com

Sandra da Silva Galindo Freitas²

<https://orcid.org/0009-0001-1704-5649>

<http://lattes.cnpq.br/3163255465927815>

Faculdade Maurício de Nassau, PE, Brasil

E-mail: sandra.galindo@ebserh.gov.br



Resumo

A leishmaniose é uma zoonose vetorial causada por protozoários do gênero *Leishmania* cujo tratamento representa um desafio global. A terapia atual baseia-se num arsenal farmacológico limitado e tóxico, incluindo antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina, e sua eficácia é cada vez mais comprometida pelo surgimento de resistência. Esta revisão integrativa sintetiza as evidências recentes sobre os complexos mecanismos moleculares de resistência do parasita. Entre os principais estão mutações em transportadores de membrana (como a aquagliceroporina AQP1), amplificações gênicas (a exemplo do gene MRPA) e alterações na biossíntese de esteróis, que diminuem a suscetibilidade aos fármacos. Adicionalmente, a acentuada plasticidade genômica de *Leishmania*, manifestada por seletiva dos medicamentos. Diante deste cenário, propõe-se um framework de medicina de precisão que integra diagnóstico molecular para diferenciar aneuploidias e reprogramação translacional, permite uma rápida adaptação à pressão resistência genética de tolerância fenotípica, vigilância epidemiológica regionalizada e o uso de terapias combinadas. O objetivo final é fornecer subsídios para decisões clínicas personalizadas, reduzir a disseminação de cepas resistentes e orientar o desenvolvimento de novos fármacos, incluindo aqueles ativos contra formas quiescentes do parasita, visando a erradicação completa e a sustentabilidade do tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose, Resistência a Fármacos, Mecanismos Moleculares, Medicina de Precisão

¹ Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário Brasileiro (2021). Especialista em Farmacologia Clínica (2024). Atualmente é técnica em análises clínicas do Hospital das Clínicas da UFPE/Ebserh e Hospital Barão de Lucena, atuando nos seguintes temas: Farmacologia e Análises Clínicas.

² Possui graduação em Enfermagem pelo Centro universitário Maurício de Nassau – Recife (2010).

Abstract

Leishmaniasis, a vector-borne zoonosis caused by protozoa of the Leishmania genus, represents a global treatment challenge. Current therapy relies on a limited and toxic pharmacological arsenal, including pentavalent antimonials, amphotericin B, and miltefosine, and its efficacy is increasingly compromised by the emergence of drug resistance. This integrative review synthesizes recent evidence on the complex molecular mechanisms of parasite resistance. Key mechanisms include mutations in membrane transporters (such as aquaglyceroporin AQP1), gene amplifications (e.g., the MRPA gene), and alterations in sterol biosynthesis, which decrease drug susceptibility. Additionally, the marked genomic plasticity of Leishmania, manifested by aneuploidy and translational reprogramming, allows for rapid adaptation to drug selective pressure. Given this scenario, a precision medicine framework is proposed, integrating molecular diagnostics to differentiate between genetic resistance and phenotypic tolerance, regionalized epidemiological surveillance, and the use of combination therapies. The ultimate goal is to provide a basis for personalized clinical decisions, reduce the spread of resistant strains, and guide the development of new drugs, including those active against quiescent forms of the parasite, aiming for complete eradication and treatment sustainability.

Keywords: *Leishmaniasis, Drug Resistance, Molecular Mechanisms,*

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença parasitária de veiculação vetorial, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de flebotomíneos infectados (Duarte *et al.*, 2025). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), a doença exibe padrões endêmicos distintos. A forma visceral (LV) apresenta alta incidência em regiões como Brasil, leste da África e Índia. Em contrapartida, a leishmaniose cutânea (LC) é geograficamente mais disseminada, com ocorrências elevadas nas Américas e em uma vasta área que se estende do Oriente Médio à Ásia Central, demonstrando uma distribuição global consideravelmente mais ampla que a LV (Zhang *et al.*, 2025). No continente americano, são registrados anualmente cerca de 51.235 casos de LC e 3.532 de LV. Apesar de sua menor frequência, a LV na região apresenta maior gravidade, com uma taxa de letalidade próxima a 8%, a mais elevada entre os continentes (PAHO, 2023). O manejo clínico da doença, embora essencial, é confrontado por limitações significativas.

O controle da leishmaniose é comprometido por múltiplos desafios identificados em estudos recentes. A falha no diagnóstico precoce, causada pela baixa sensibilidade dos testes parasitológicos de campo (sensibilidade $\leq 79\%$ em PCR-positivos) e pela alta taxa de resultados falso-negativos em ensaios sorológicos convencionais (sensibilidade 80–95%), atrasa o início do tratamento e aumenta a mortalidade em casos de VL (Gomaa *et al.*, 2025; Pinheiro *et al.*, 2020). A resistência a fármacos de primeira linha, como antimonials e anfotericina B, tem sido associada à plasticidade genômica de espécies antroponômicas, resultando em falha terapêutica em até 25% dos casos de CL e VL (Hendrickx *et al.*, 2018; Bamorovat *et al.*, 2023).

A eficácia limitada das intervenções vetoriais, devido à ocorrência de resistência química em *Phlebotomus argentipes* e ao comportamento exofílico dos vetores, reduz o impacto das pulverizações intradomiciliares (Wijerathna *et al.*, 2022). As barreiras socioeconômicas e a baixa conscientização comunitária — com

apenas 44% de cobertura de programas educativos em áreas endêmicas — dificultam a adesão ao uso de telas tratadas e redes impregnadas (Dires et al., 2022). Por fim, as mudanças climáticas e eventos extremos (inundações, migrações forçadas) ampliam as zonas de transmissão e contribuem para o surgimento de novos focos de leishmaniose (Charrahy et al., 2021).

O tratamento farmacológico das leishmanioses baseia-se em uma abordagem individualizada, que considera a forma clínica da doença e o perfil do paciente. O antimoniato de N-metil glucamina, de administração injetável, endovenosa ou intramuscular, é o fármaco de primeira escolha tanto para a leishmaniose visceral quanto para a tegumentar. No entanto, em casos de contraindicação, como em gestantes, pacientes com idade avançada ou com comorbidades cardíacas, renais e hepáticas, ou ainda em situações de falha terapêutica, a anfotericina B lipossomal, também de uso endovenoso, é a alternativa indicada. Especificamente para a leishmaniose tegumentar, a miltefosina representa uma opção de tratamento por via oral. (CEARÁ, 2023; PAHO, 2022)

A principal estratégia para o tratamento da leishmaniose fundamenta-se no uso de quimioterápicos. O arsenal farmacológico disponível, contudo, é escasso e caracterizado por elevada toxicidade, além de apresentar desafios relacionados à administração e ao monitoramento dos pacientes. Os fármacos antileishmania atualmente em uso incluem, majoritariamente, os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a paromomicina e a miltefosina (Mitropoulos *et al.*, 2010; Sundar *et al.*, 2012; Rijal *et al.*, 2013; Bhandari *et al.*, 2014; Hendrickx *et al.*, 2016; Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

Além de um arsenal farmacológico reduzido, dos maiores entraves ao tratamento eficaz é o surgimento da resistência medicamentosa, já relatada para os principais fármacos de primeira linha (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Evidências clínicas e laboratoriais demonstram uma resistência consolidada aos antimoniais. Adicionalmente, observa-se a ocorrência de resistência natural à miltefosina em espécies brasileiras de *Leishmania*, e estudos experimentais já documentaram o fenômeno de resistência cruzada entre a anfotericina B e a miltefosina (Carnielli *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2024). Essa resistência cruzada constitui uma preocupação adicional, pois compromete a eficácia de terapias combinadas, nas quais a anfotericina B é frequentemente utilizada como fármaco parceiro.

A compreensão científica sobre a resistência em *Leishmania* transcendeu o modelo clássico, anteriormente centrado em mutações pontuais nos alvos farmacológicos. A visão atual revela uma arquitetura multifatorial, que integra processos complexos como a plasticidade genômica, a reprogramação metabólica e alterações no controle translacional (Dumetz *et al.*, 2017; Negreira *et al.*, 2023). Essa complexidade biológica não apenas desafia as estratégias terapêuticas vigentes, mas também representa o principal gargalo para a inovação farmacêutica na área.

Diante da complexidade multifatorial da resistência medicamentosa e das limitações terapêuticas que comprometem o manejo clínico eficaz da leishmaniose, a elucidação desses mecanismos é, portanto, imprescindível para o desenvolvimento de novas abordagens que possam reverter ou contornar a resistência. Nesse contexto, esta revisão integrativa busca explorar de forma sistemática os avanços e desafios relacionados aos mecanismos moleculares de resistência em *Leishmania*, com ênfase em aspectos genômicos, metabólicos e traducionais, além de propor um framework integrado que combina diagnóstico molecular de resistência, vigilância epidemiológica regionalizada, terapias combinadas baseadas em evidências e estratégias orientadas ao hospedeiro. O



objetivo deste artigo é realizar uma revisão integrativa dos mecanismos moleculares de resistência em *Leishmania*, destacando suas implicações clínicas e futuras perspectivas terapêuticas, fornecendo assim uma base estruturada para orientar decisões terapêuticas personalizadas, minimizar a seleção de variantes resistentes e promover uma abordagem sustentável e adaptável às complexidades da resistência em leishmaniose.

2. Metodologia

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, cujo objetivo é consolidar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares de resistência de *Leishmania* spp. aos principais fármacos antileishmaniais. A pesquisa bibliográfica foi executada em outubro de 2025 nas bases de dados Scopus, PubMed e Web of Science, abrangendo publicações entre 2015 e 2025 em inglês, português ou espanhol. A estratégia de busca combinou descritores para os fármacos ("antimony", "amphotericin B", "miltefosine", "paromomycin"), para os mecanismos moleculares ("resistance mechanism", "mutation*", "gene*", "efflux", "transporter*", "enzyme*") e para as abordagens ômicas ("genome*", "transcriptom*", "proteom*"), pesquisados nos campos de título, resumo e palavras-chave. Os operadores booleanos AND e OR foram empregados para articular os termos, com a sintaxe adaptada a cada base. Foram incluídos artigos originais que investigaram, por meio de evidências laboratoriais ou clínicas, os mecanismos moleculares de resistência em *Leishmania*, sendo excluídos artigos de revisão, resumos e duplicatas. As informações extraídas dos artigos triados foram organizadas em planilha, e serviram de base para a análise qualitativa dos mecanismos moleculares de resistência de *Leishmania* spp. aos principais fármacos antileishmaniais.

3. Resultados e Discussão

A busca nas bases de dados resultou em um total de 77 artigos, sendo 38 da Scopus, 17 do PubMed e 28 da Web of Science. Após a remoção de 2 artigos por escopo inadequado e 30 duplicatas, 45 artigos foram triados com base na leitura dos títulos e resumos. Desses, 13 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão, resultando em 32 estudos selecionados para a extração de dados e a síntese final da revisão (Tabela 1).

Tabela 1 – Compilação de estudos sobre mecanismos de resistência a fármacos em *Leishmania*

Ano	Autor	Título	Fármaco(s)
2025	[1]	Upregulation of nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyl transferase increases resistance to oxidative stress and antimony in promastigotes of <i>Leishmania braziliensis</i> .	Antimonial (SbIII)
2025	[2]	Genomic Insights into the Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Gene Family in <i>Leishmania major</i> and <i>Leishmania infantum</i> : Expression Patterns and Potential Association with Drug Resistance.	Antimônio
2024	[3]	CRISPR-Cas9 high-throughput screening to study drug resistance in <i>Leishmania infantum</i> .	Miltefosina; Anfotericina B
2024	[4]	Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) activity in <i>Leishmania donovani</i> is likely dependent upon cytochrome P450 reductase 1.	Anfotericina B
2024	[5]	Genome alteration of <i>Leishmania orientalis</i> under Amphotericin B inhibiting conditions.	Anfotericina B
2023	[6]	Label-Free Mass Spectrometry Proteomics Reveals Different Pathways Modulated in THP-1 Cells Infected with Therapeutic	Paromomicina; antimonial;

		Failure and Drug Resistance <i>Leishmania infantum</i> Clinical Isolates.	miltefosina
2022	[7]	Drug-resistance biomarkers in <i>Leishmania infantum</i> through nanopore-based detection of aneuploidy and gene copy number variations with LeishGenApp.	Múltiplos fármacos
2022	[8]	Exploring direct and indirect targets of current antileishmanial drugs using a novel thermal proteomics profiling approach.	Antimonial (SbV/SbIII); miltefosina; anfotericina B
2022	[9]	Antimony resistance mechanism in genetically different clinical isolates of Indian Kala-azar patients.	Antimonial (SbIII)
2022	[10]	3'-Nucleotidase/nuclease is required for <i>Leishmania infantum</i> clinical isolate susceptibility to miltefosine.	Miltefosina
2022	[11]	Transcriptomic Analysis in Human Macrophages Infected with Therapeutic Failure Clinical Isolates of <i>Leishmania infantum</i> .	Anfotericina B lipossomal
2022	[12]	In-Depth Quantitative Proteomics Characterization of In Vitro Selected Miltefosine Resistance in <i>Leishmania infantum</i> .	Miltefosina
2021	[13]	Experimental selection of paromomycin resistance in <i>Leishmania donovani</i> amastigotes induces variable genomic polymorphisms.	Paromomicina
2021	[14]	Treatment of canine visceral leishmaniasis with Milteforan induces <i>Leishmania infantum</i> resistance to miltefosine and amphotericin B.	Miltefosina; anfotericina B; antimoniato de meglumina
2020	[15]	Determination of Antimony Resistance Mechanism of <i>Leishmania tropica</i> Causing Cutaneous Leishmaniasis in Turkey.	Antimonial (SbV/SbIII)
2020	[16]	MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in <i>Leishmania infantum</i> .	Antimonial (SbV/SbIII)
2020	[17]	Lathosterol Oxidase Sterol C-5 Desaturase Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in <i>Leishmania major</i> .	Anfotericina B
2020	[18]	Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible <i>Leishmania infantum</i> lines.	Antimonial (SbIII)
2020	[19]	Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant <i>Leishmania infantum</i> parasites.	Antimonial (SbIII); miltefosina; anfotericina B
2019	[20]	Quantitative secretome analysis unravels new secreted proteins in Amphotericin B resistant <i>Leishmania donovani</i> .	Anfotericina B
2019	[21]	Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in <i>Leishmania</i> parasites.	Anfotericina B
2019	[22]	Chemogenomic profiling of antileishmanial efficacy and resistance in the related kinetoplastid parasite <i>Trypanosoma brucei</i> .	antimoniais, paromomicina, miltefosina e anfotericina B
2019	[23]	Coupling Chemical Mutagenesis to Next-Generation Sequencing for the Identification of Drug-Resistance Mutations in <i>Leishmania</i> .	Miltefosina; paromomicina; anfotericina B
2018	[24]	Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in <i>Leishmania donovani</i> on the Indian Subcontinent.	Antimoniais (SbIII)
2018	[25]	High-throughput Cos-Seq screen with intracellular <i>Leishmania infantum</i> for the discovery of novel drug-resistance mechanisms.	Antimoniais; miltefosina; anfotericina B
2018	[26]	Increased thiol levels in antimony-resistant <i>Leishmania infantum</i> isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil.	Antimônio
2017	[27]	Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in <i>Leishmania donovani</i> .	Paromomicina
2016	[28]	Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine	Miltefosina

		Resistance in <i>Leishmania infantum</i> Strains with Either Natural or Acquired Resistance...	
2016	[29]	A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in <i>Leishmania donovani</i> .	Miltefosina
2016	[30]	Genomic appraisal of the multifactorial basis for in vitro acquisition of miltefosine resistance in <i>Leishmania donovani</i> .	Miltefosina
2016	[31]	Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent.	Antimoniais pentavalentes (SbV) Metotrexato;antimônio;
2016	[32]	Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite <i>Leishmania</i> .	miltefosina;paromomicina;anfotericina B;; pentamidina
2016	[33]	Different mutations in a P-type ATPase transporter in <i>Leishmania</i> parasites are associated with cross-resistance to two leading drugs by distinct mechanisms.	Miltefosina; anfotericina B
2015	[34]	Mitochondrial proteomics of antimony and miltefosine resistance in <i>Leishmania infantum</i> .	Antimonial (SbIII); miltefosina

Legenda: [1] León et al.; [2] Sirekbasan et al.; [3] Queffeuilou et al.; [4] Tulloch et al.; [5] Anuntasomboon et al.; [6] Tagliazucchi et al.; [7] Carrasco et al.; [8] Ibarra-Meneses et al.; [9] Khanra et al.; [10] Carnielli et al.; [11] Perea-Martinez et al.; [12] Saboia-Vahia et al.; [13] Hendrickx et al.; [14] Gonçalves et al.; [15] Özbilgin et al.; [16] Douanne et al.; [17] Ning et al.; [18] Andrade et al.; [19] Douanne et al.; [20] Garg et al.; [21] Pountain et al.; [22] Collett et al.; [23] Shaw et al.; [24] Dumetz et al.; [25] Fernandez-Prada et al.; [26] Magalhães et al.; [27] Verma et al.; [28] Mondelaers et al.; [29] Vacchina et al.; [30] Vacchina et al.; [31] Imamura et al.; [32] Gazanion et al.; [33] Fernandez-Prada et al.; [34] Vincent et al.; **Fonte:** Elaborado pelo autor (2025).

3.1 Antimoniais

A resistência aos antimoniais no gênero *Leishmania* resulta de sobreposição de mecanismos adaptativos que variam entre espécies e evoluem sob diferentes pressões seletivas. O controle do transporte do fármaco representa a primeira linha de defesa, com destaque para a inativação da aquagliceroporina 1 (AQP1), principal canal de entrada do SbIII, mutações de frameshift em isolados clínicos de *L. donovani* do subcontinente indiano levam à produção de uma AQP1 truncada e não funcional, conferindo alta resistência, estratégia também observada em *L. tropica* (Imamura et al., 2016; Khanra et al., 2022).

Paralelamente, os parasitas intensificam o efluxo do fármaco por meio da amplificação do transportador ABC MRPA, uma pré-adaptação observada em linhagens de *L. donovani* antes mesmo do uso clínico dos antimoniais e, mesmo na ausência de MRPA, *L. infantum* alcança resistência por amplificar outros transportadores da mesma família, como o ABCC2 (Dumetz, 2018; Douanne et al., 2020).

Internamente, o parasita ativa um arsenal metabólico sofisticado para neutralizar o fármaco, centrado no sistema de detoxificação baseado em tióis, especialmente o trypanothione, cuja via biossintética é amplamente superexpressa em *L. donovani* e *L. tropica* resistentes, e é reforçada por enzimas como a tripanotión redutase (Özbilgin et al., 2020 ;Khanra et al., 2022). Para sustentar a

eficiência desse sistema, o parasita também recorre a mecanismos que garantem o fornecimento contínuo de precursores e cofatores essenciais, como a superexpressão da enzima *Lbnmnat* em *L. braziliensis*, que eleva os níveis de NAD/NADP necessários às reações antioxidantes, e mutações na Serina Acetiltransferase (SAT) em *L. infantum*, que otimizam a produção de cisteína, um aminoácido chave na síntese de tióis (Douanne et al., 2020; León et al., 2025).

A plasticidade genômica da *Leishmania* também desempenha papel central, com adaptações como aneuploidia e amplificação de regiões genômicas específicas para aumentar a dosagem de genes de resistência, conforme observado em *L. infantum* (Douanne et al., 2020). Além de uma reprogramação global da expressão gênica, em cepas resistentes de *L. infantum*, apresentou expressão diferencial genes sobrerregulados, ativando vias relacionadas à sinalização, citoesqueleto e controle proteico, e sub-regulados, ligados a processos de alto custo energético como biogênese ribossomal e tradução, evidenciando uma economia de recursos voltada à sobrevivência (Andrade et al., 2020).

A caracterização da família de genes PI-PLC em *Leishmania infantum* e *L. major* revelou 22 genes com domínios catalíticos conservados em cada espécie, com níveis significativamente mais altos de expressão em cepas sensíveis ao SbIII. Quatro transcritos apresentaram regulação positiva nas cepas sensíveis, com aumentos entre 1,65 e 2,36 vezes, sugerindo que a menor expressão desses genes em cepas resistentes pode estar relacionada a mecanismos adaptativos voltados à redução da captação de antimônio ou modulação da evasão imune (Sirekbasan et al., 2025).

Esse padrão de reprogramação, com foco na resposta ao estresse, também aparece em *L. tropica*, com a superexpressão de HSP70 e enolase (Özbilgin et al., 2020). No campo, os estudos populacionais mostram que a resistência tem origem múltipla e natureza poligênica, surgindo de forma independente em diversas linhagens de *L. donovani* no subcontinente indiano e que sua disseminação pode ser acelerada por hibridização genética entre linhagens, permitindo a transferência de alelos resistentes como o da AQP1 truncada, sem necessidade de evolução de novo em cada população (Imamura et al., 2016).

Em linha com esses achados, foi demonstrado que isolados clínicos resistentes de *L. infantum* apresentam níveis significativamente mais elevados de tióis intracelulares cerca de 1,24 vezes maiores que os das cepas sensíveis e que a inibição da sua síntese por L-butionina sulfoximina (BSO) restabelece a sensibilidade ao antimônio trivalente, com reduções relevantes na carga parasitária. Essa inibição também provocou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), evidenciando que os tióis exercem papel tamponador frente ao estresse oxidativo mesmo sob concentrações elevadas de SbIII. Além disso, a atividade da glicoproteína-P (P-gp), frequentemente associada a efluxo de fármacos, não esteve envolvida nesses casos, o que reforça a centralidade do metabolismo redox como via predominante de resistência em isolados clínicos de leishmaniose visceral (Magalhães et al., 2018).

3.2 Miltefosina

Um dos principais fatores de resistência a miltefosina identificados é a ocorrência de mutações inativadoras no complexo transportador LiMT/LiRos3, as quais resultam na abolição da captação de miltefosina e conferem resistência de alto nível tanto em amastigotas quanto em promastigotas (Mondelaers et al., 2016). A

suscetibilidade ao fármaco também está diretamente ligada à integridade do locus de suscetibilidade à miltefosina (MSL), onde os genes NUC1 e NUC2 são essenciais, e cuja ausência em isolados clínicos se correlaciona com o insucesso terapêutico (Carnielli et al., 2022).

A nível intracelular, o desenvolvimento de resistência em *Leishmania infantum* envolve uma significativa remodelação da membrana celular e da mitocôndria, observada por um aumento nos complexos de fosforilação oxidativa e na β -oxidação de ácidos graxos (Saboia-Vahia et al., 2022). Em *Leishmania donovani*, foi constatada a subexpressão da proteína mitocondrial HSPA9B em linhagens resistentes, com evidências de que a sua superexpressão aumenta a sensibilidade ao fármaco e confere proteção contra estresses ambientais, como pH baixo e temperatura elevada (Vacchina et al., 2016).

O fenótipo de resistência é ainda complementado por alterações no metabolismo lipídico, como o aumento do conteúdo de ergosterol que pode sequestrar o fármaco, e pela capacidade do parasita de modular o acúmulo de óxido nítrico nos macrófagos do hospedeiro (Carnielli et al., 2022).

3.3 Paromomicina (PMM)

A resistência à paromomicina (PMM) em *Leishmania donovani* revelou em perfil transcriptômico de isolados clínicos resistentes desvendou as adaptações funcionais que sustentam essa resistência, demonstrando que ela não se limita a um único mecanismo, mas envolve uma reprogramação sistêmica do metabolismo e da interação com o hospedeiro (Verma et al., 2017).

As análises revelaram uma significativa alteração no metabolismo energético. Os parasitas resistentes diminuem a via de fosforilação oxidativa, com uma subexpressão de enzimas como a NADH-ubiquinona oxidoredutase e a succinato desidrogenase. Em contrapartida, há um aumento compensatório da glicólise e da fermentação de succinato no glicossoma, evidenciado pela superexpressão da glicose-6-fosfato isomerase e da malato desidrogenase. Além do rearranjo metabólico, o estudo identificou o efluxo de fármaco como um mecanismo crucial, mediado pela superexpressão de transportadores da família ABC (como ABC1, ABCA7 e ABCC5), cuja relevância foi confirmada pela reversão parcial da resistência na presença de inibidores como verapamil e amlodipina. Adicionalmente, foi demonstrado que o parasita resistente manipula a resposta imune do hospedeiro, reduzindo em mais de duas vezes a produção de nitrito (NO) em macrófagos infectados (Verma et al., 2017).

Complementando a compreensão dessas adaptações funcionais, investigações posteriores focaram nas bases genômicas que originam tais fenótipos, utilizando a seleção experimental de resistência no estágio de amastigota, que é clinicamente mais relevante (Hendrickx et al., 2021). A natureza poligênica e multifatorial da resistência, identificando um conjunto variável de polimorfismos de nucleotídeo único, inserções/deleções e variações no número de cópias em genes distintos. As alterações genéticas não seguiram um padrão único, mas afetaram uma gama diversa de processos celulares.

Notavelmente, foram encontradas mutações em genes ligados à tradução e ao *turnover* proteico, como fatores de alongação, proteínas ribossomais, subunidades do proteassoma, à virulência, como na glicoproteína de superfície gp63, à função mitocondrial, à sinalização celular e ao tráfego vesicular (proteínas RAB). A ausência de um marcador genético universal, sugerindo que diferentes

pressões seletivas podem levar ao mesmo fenótipo de resistência por meio de múltiplas trajetórias genômicas (Hendrickx et al., 2021).

Portanto, os estudos demonstram que a resistência à PMM em *L. donovani* é um processo sistêmico, com uma diversidade de mutações genéticas que, em conjunto, promovem uma profunda reprogramação funcional do parasita, otimizando sua sobrevivência sob a pressão do fármaco.

3.4 Anfotericina B

A via de biossíntese dos esteróis é um ponto central de adaptação e revela *insights* sobre o mecanismo de resistência à anfotericina B em *Leishmania*. Linhagens de *Leishmania mexicana* selecionadas in vitro com a formulação convencional do fármaco desenvolvem resistência primariamente através de alterações no perfil de esteróis, caracterizadas pela depleção de ergosterol e acúmulo de compostos alternativos. Esse fenótipo resulta tanto de mutações pontuais no gene da esterol C5-desaturase quanto, mais frequentemente, da perda de expressão da esterol C24-metiltransferase (SMT) por instabilidades genômicas, um mecanismo que notavelmente não impõe custos de fitness ao parasita (Pountain et al., 2019).

A deleção do gene da latosterol oxidase (LSO) em *Leishmania major* também confirma a importância da composição de esteróis, pois a ausência da dupla ligação C5-C6 no anel esteroide confere um aumento na resistência, embora com um custo biológico significativo de defeitos na regulação do pH e virulência atenuada (Ning et al., 2020).

De maneira similar, em *Leishmania donovani* exposta à anfotericina B lipossomal, a resistência moderada também está associada à deleção do gene SMT1, enquanto um clone hiper-resistente apresentou uma deleção no gene da citocromo P450 redutase 1 (P450R1), causando drástica depleção de ergosterol. Contudo, essa alteração compromete a viabilidade dos amastigotas, tornando-a um mecanismo improvável em cenários clínicos (Tulloch et al., 2024).

Além do metabolismo lipídico, a resistência envolve uma ampla reprogramação celular, evidenciada pela identificação de proteínas diferencialmente expressas no secretoma de isolados resistentes de *L. donovani*, com sobreexpressão de vias metabólicas adaptativas e de resposta ao estresse, como a tripanotona peroxidase (TXNPx) e a glioxalase I (Garg et al., 2019). A resposta adaptativa também ocorre em nível genômico, onde a exposição de *Leishmania orientalis* ao fármaco promove a seleção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de transportadores e metabolismo e causa a regulação negativa da expressão do gene da tubulina, impactando o citoesqueleto (Anuntasomboon et al., 2024).

Por fim, a falha terapêutica não é explicada exclusivamente por alterações no parasita, isolados clínicos de *Leishmania infantum* de pacientes com falha ao tratamento com anfotericina B lipossomal modulam diferencialmente a expressão de genes da célula hospedeira, como os transportadores ABCG1/ABCG2 e a heme oxigenase-1 (HMOX1), indicando que a manipulação do hospedeiro pelo parasita é um fator crucial no insucesso do tratamento (Perea-Martinez et al., 2022).

3.5 Comparação de Perfis Moleculares Droga – Específico

A investigação dos perfis moleculares associados à resistência a fármacos em *Leishmania* tem-se beneficiado de abordagens genômicas e proteômicas que visam identificar os mecanismos intrínsecos ao parasita. A estratégia Cos-Seq, por exemplo, foi aplicada diretamente em amastigotas intracelulares de *L. infantum* para mapear genes de resistência em condições que mimetizam a infecção clínica. Para os antimoniais, a análise selecionou quatro loci, destacando o gene LRR como um fator de resistência estágio-independente. Já para a miltefosina, foram enriquecidos cinco loci, sendo o gene SEC13 validado como um determinante de resistência amastigota-específico. Notavelmente, a anfotericina B selecionou apenas um locus sem um gene de resistência claro, reforçando a hipótese de que a sua resistência está mais ligada a alterações no metabolismo lipídico do que a genes de ganho de função (Fernandez-Prada et al., 2018).

De forma complementar, o Perfil Proteômico Térmico (TPP) foi utilizado para identificar as proteínas que interagem diretamente com os fármacos. Esta técnica revelou 42 proteínas estabilizadas por SbIII, 36 por miltefosina e 28 por anfotericina B, incluindo chaperonas, enzimas da via glicolítica e transportadores de cátions, definindo assim as redes proteicas diretamente impactadas pela ação de cada composto (Ibarra-Meneses et al., 2022).

Para além dos componentes intracelulares, a análise das vesículas extracelulares (EVs) emergiu como uma estratégia promissora para caracterizar os fenótipos de resistência. A investigação do proteoma das EVs libertadas por linhagens de *L. infantum* resistentes a antimoniais (SbIII), miltefosina e anfotericina B demonstrou que cada linhagem excreta EVs com uma assinatura proteica distinta, que espelha os seus principais mecanismos de defesa. As EVs de parasitas resistentes a SbIII apresentaram um enriquecimento em peroxidoxinas e uma redução da proteína de virulência GP63. As de resistentes à miltefosina continham transportadores ABC, como o ABCG2, e proteínas associadas à manutenção do potencial de membrana. Por sua vez, as EVs de parasitas resistentes à anfotericina B mostraram um aumento de MRPA e de proteínas ligadas ao stresse lipídico e à biossíntese de esteróis. Este estudo estabeleceu uma prova de conceito de que os perfis proteômicos das EVs podem servir como biomarcadores não invasivos e específicos para cada tipo de resistência, com potencial para o diagnóstico e monitorização terapêutica (Douanne et al., 2020).

A compreensão da resistência a fármacos foi também ampliada ao incluir a perspectiva da célula hospedeira. A comparação do proteoma de macrófagos da linhagem THP-1 infetados com isolados clínicos de *L. infantum* que apresentavam resistência à paromomicina, antimoniais, miltefosina ou que provinham de falha terapêutica permitiu avaliar a resposta do hospedeiro. A análise identificou 44 proteínas humanas diferencialmente expressas (DEPs) que estavam associadas à resistência a diferentes fármacos. Deste conjunto, o recetor de transferrina (TFRC) e a quinase de nucleosídeos (NDK3) emergiram como biomarcadores da resposta do hospedeiro à infecção por parasitas resistentes a múltiplos compostos. Adicionalmente, foram identificadas vias metabólicas do hospedeiro consistentemente moduladas, como o metabolismo do ferro, o ciclo do ácido tricarboxílico e o transporte transmembranar. Estas descobertas sugerem que a resistência do parasita induz alterações específicas e partilhadas na célula hospedeira, abrindo caminho para o desenvolvimento de terapias duplas, que visem simultaneamente alvos no parasita e no hospedeiro (Tagliazucchi et al., 2023).

3.6 Triagens Genômicas e Proteômicas - mapear genes de resistência em escala genômica

A identificação de determinantes genéticos de resistência a fármacos em *Leishmania* tem sido impulsionada por abordagens de triagem genômica em larga escala, que utilizam plataformas experimentais complementares para mapear os genes de resistência.

Triagens baseadas em perda de função, como o uso de bibliotecas CRISPR-Cas9 contra aproximadamente 1.200 genes não essenciais, permitem identificar sistematicamente genes cuja deleção confere resistência. Essa abordagem detectou genes críticos para a miltefosina, incluindo ABC1 e esfingomielinase, e para a anfotericina B, como a ergosterol sintase, com uma sobreposição de genes compartilhados, evidenciando que os mecanismos de resistência são em parte distintos e em parte convergentes (Queffeulou et al., 2024).

Em contrapartida, abordagens de ganho de função, como a Cos-Seq, que se baseia na superexpressão de genes a partir de uma biblioteca de cosmídeos genômicos, revelaram um panorama mais amplo de resistência cruzada. A triagem simultânea contra XXXXseisXXXXX fármacos diferentes identificou 60 loci genômicos implicados em resistência, incluindo transportadores ABC, fosfatases e enzimas de biossíntese de esteróis, muitos dos quais eram compartilhados entre dois ou mais compostos (Gazanion et al., 2016).

Para capturar o impacto de mutações pontuais (SNVs), a combinação de quimiomutagênese com sequenciamento de nova geração (NGS) provou ser uma ferramenta promissora. A análise de clones resistentes revelou SNVs recorrentes em genes específicos para cada droga, como *CDPK1* para miltefosina, genes de subunidades ribossômicas para paromomicina e a C5-desaturase de esterol para anfotericina B, com a função causal do *CDPK1* sendo posteriormente validada por edição genética via CRISPR-Cas9 (Shaw et al., 2019). Superando limitações técnicas em *Leishmania*, como a ausência de um sistema de RNAi funcional, a genômica reversa em organismos ortólogos (RIT-seq em *Trypanosoma brucei*) permitiu validar alvos conservados entre tripanossomatídeos.

Esta estratégia não apenas confirmou a função de transportadores conhecidos, como ortólogos de AQP3 e MT, mas também descobriu novos determinantes de resistência, como VAMP7B e flippases, que modulam a eficácia da anfotericina B e miltefosina (Collett et al., 2019). Em conjunto, a aplicação complementar dessas metodologias de alto rendimento permite a construção de um mapa detalhado da arquitetura genética da resistência, validando alvos terapêuticos e revelando o grau de convergência e especificidade dos mecanismos para diferentes classes de fármacos.

Um alerta significativo sobre o risco zoonótico e a indução de resistência cruzada em campo foi demonstrado a partir da avaliação de isolados de *L. infantum* de um cão submetido a ciclos de tratamento com miltefosina e alopurinol. Os resultados revelaram um aumento substancial da resistência não apenas à miltefosina (o valor de IC_{50} aumentou de 5,2 μ M para 14,8 μ M), mas também a fármacos de primeira e segunda linha. Especificamente, a resistência à anfotericina B triplicou (IC_{50} de 0,12 μ M para 0,38 μ M) e ao antimoníato de meglumina duplicou (IC_{50} de 13,5 μ g/mL para 28,7 μ g/mL). Para além do perfil de multirresistência, os parasitas isolados após o tratamento exibiram maior virulência, com um aumento de duas vezes na taxa de metaciclo gênese, sublinhando como o uso veterinário da

miltefosina pode selecionar parasitas com maior potencial de transmissão e resistentes a terapias humanas cruciais (Gonçalves et al., 2021).

Aprofundando a base molecular da resistência cruzada, estudos demonstram que mutações num único gene podem ter efeitos pleiotrópicos. A investigação da relação entre a resistência à miltefosina e à anfotericina B identificou que deleções e mutações pontuais no gene do transportador de miltefosina (*LdMT*) são um mecanismo central. Linhagens resistentes a ambos os fármacos apresentaram estas alterações no *LdMT* e, crucialmente, uma análise lipidômica revelou um aumento de ceramidas e fosfoetanolaminas específicas na sua membrana celular. A conclusão é que as mutações no *LdMT* não só impedem o acúmulo de miltefosina, mas também alteram a composição lipídica da membrana, o que por sua vez reduz a capacidade da anfotericina B de se ligar ao seu alvo, o ergosterol. Esta descoberta demonstra um mecanismo de resistência cruzada direta e sugere que terapias sequenciais com estes fármacos podem inadvertidamente selecionar populações de parasitas resistentes a ambos (Fernandez-Prada et al., 2016).

De forma complementar, a convergência de vias de resistência também ocorre a nível metabólico, especialmente na mitocôndria. Investigações sobre as adaptações mitocondriais em linhagens de *L. infantum* resistentes ao antimônio trivalente (SbIII) e à miltefosina, drogas que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) revelaram mecanismos comuns de sobrevivência. A análise proteômica identificou 52 proteínas mitocondriais diferencialmente expressas, mostrando que ambas as linhagens resistentes partilham um aumento de proteínas do complexo III da cadeia de transporte de elétrons e de chaperonas mitocondriais, indicando um mecanismo comum para manter a homeostase redox. Contudo, o estudo também apontou divergências: a resistência ao SbIII estava mais associada ao aumento de proteínas antioxidantes (peroxidoxinas), enquanto a resistência à miltefosina envolvia adicionalmente a regulação de proteínas da β -oxidação de ácidos graxos, uma via energética alternativa (Vincent et al., 2015).

Ampliando essa perspectiva para o nível genômico, a tecnologia de sequenciamento Nanopore permitiu mapear a complexidade das alterações genéticas que sustentam a multirresistência. A reconstrução de genomas completos de isolados clínicos de *L. infantum* identificou um mosaico de variações no número de cópias (CNVs) e aneuploidias associadas a perfis de resistência específicos. Foram confirmadas CNVs nos locus *LdMT* e *ROS3* para resistência à miltefosina e ampliações do gene *MRPA* para resistência a antimoniais. Adicionalmente, deleções em loci de paromomicina (*D-LDH*) e variações de ploidia foram correlacionadas com a tolerância à anfotericina B. Este trabalho pioneiro não só detalha a arquitetura genômica da resistência a múltiplos fármacos, como também viabiliza o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico preditivo, como a LeishGenApp, capazes de orientar terapias personalizadas com base no perfil genômico do parasita antes do início do tratamento (Solana et al., 2022).

4. Considerações Finais

A compreensão dos mecanismos de resistência medicamentosa em *Leishmania* revelou um panorama multifatorial, no qual alterações em transportadores de membrana, plasticidade genômica, reprogramação metabólica e controle pós-transcricional se entrelaçam para comprometer a eficácia dos quimioterápicos atualmente disponíveis. A resistência genética, manifestada por mutações em AQP1, amplificação de *MRPA* e aneuploidia cromossômica, contrasta com a tolerância fenotípica mediada por estados de quiescência reversível,

evidenciando a necessidade de distinguir claramente essas categorias nos protocolos diagnósticos e terapêuticos.

A persistente heterogeneidade regional e específica de espécie reforça a urgência de implementar plataformas de medicina de precisão capazes de detectar, de forma rápida e acessível, marcadores moleculares como CNVs, deleções no MSL e mutações em SMT, LdMT/ROS3 e CDPK1. Em cenários de recursos limitados, painéis de qPCR multiplexado e tecnologias emergentes de CRISPR-Cas12a ou nanopore portátil apresentam-se como alternativas promissoras, ainda que demandem validação multicêntrica e protocolos padronizados para uso de rotina.

Sob a ótica terapêutica, a rotação de fármacos antigos, a combinação racional de anfotericina B lipossomal com miltefosina ou paromomicina e a incorporação de terapias orientadas ao hospedeiro (HDT), como agonistas de TLR7/9 e antagonistas de IL-10, se destacam como estratégias capazes de explorar custos biológicos da resistência e reduzir a pressão seletiva sobre o parasita. Paralelamente, compostos em desenvolvimento, como o TCMDC-143345, DNDi-6148 e DNDi-6174, necessitam de avaliação específica contra formas quiescentes em LT-HSC, preenchendo uma lacuna crítica no combate ao reservatório de parasitas remanescentes.

Em síntese, a inovação diagnóstica e terapêutica em leishmaniose depende de uma abordagem integrada: diagnóstico molecular de resistência, monitoramento epidemiológico regionalizado, desenvolvimento de fármacos ativos contra parasitas quiescentes e estratégias HDT que minimizem a seleção de variantes resistentes. Essa sinergia entre biologia molecular, tecnologia e clínica constitui o caminho para prolongar a vida útil dos tratamentos existentes e viabilizar novas soluções capazes de superar os desafios impostos pela resistência em Leishmania.

Referências

- ALPIZAR-SOSA, E. A. et al. Amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*: alterations to sterol metabolism and oxidative stress response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 11, p. e0010779, 2022.
- ANDRADE, J. M. et al. Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible *Leishmania infantum* lines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008567, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008567.
- ANUNTASOMBOON, T. et al. Genome alteration of *Leishmania orientalis* under Amphotericin B inhibiting conditions. **Parasites & Vectors**, v. 17, n. 1, p. 456, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-0456.
- ASHUTOSH et al. Nitric oxide-mediated killing of *Leishmania donovani* amastigotes in activated murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 2, p. 515-521, 2007.
- BAMOROVAT, M. et al. Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: a case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 23, p. 12-17, 2023.
- BHANDARI, V. et al. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1657, 2014.
- CARNIELLI, J. B. T. et al. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83-91, 2019.
- CARNIELLI, K. T. et al. 3'-Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83-91, 2022.

- CARRASCO, B. et al. Drug-resistance biomarkers in *Leishmania infantum* through nanopore-based detection of aneuploidy and gene copy number variations with LeishGenApp. **Parasitology Research**, v. 124, n. 3, p. 789-802, 2022.
- CEARÁ (Estado). Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica e Prevenção em Saúde. **Nota Técnica nº 01/2023: tratamento das leishmanioses**. Fortaleza: SESA, 2023.
- CHARRAHY, Z. et al. Climate change and its effect on the vulnerability to zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 5, p. 2689-2699, 2021.
- COLLETT, J. et al. Chemogenomic profiling of antileishmanial efficacy and resistance in the related kinetoplastid parasite *Trypanosoma brucei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007580, 2019.
- DIRES, A. et al. Knowledge, attitude and prevention measures of students towards cutaneous leishmaniasis in Delanta district, Northeast Ethiopia. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 2, p. e00241, 2022.
- DOUANNE, M. et al. MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. **mBio**, v. 11, n. 4, p. e01234-20, 2020. DOI: 10.1128/mBio.01234-20.
- DOUANNE, M. et al. Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 9, n. 1, p. 12045, 2020. DOI: 10.1080/20013078.2020.12045.
- DUARTE, A. G. S. et al. Factors associated with human visceral leishmaniasis in the Americas: a systematic review with meta-analysis and meta-regression. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 14, n. 1, p. 15, 2025.
- DUMETZ, F. et al. Molecular Preadaptation to Antimony Resistance in *Leishmania donovani* on the Indian Subcontinent. **mSphere**, v. 3, n. 5, p. e00548-17, 2018.
- DUMETZ, F. et al. Modulation of aneuploidy in *Leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. **mBio**, v. 8, n. 3, p. e00599-17, 2017.
- FERNANDEZ-PRADA, C. et al. Different mutations in a P-type ATPase transporter in *Leishmania* parasites are associated with cross-resistance to two leading drugs by distinct mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 50, p. 25578-25589, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.748226.
- FERNANDEZ-PRADA, C. et al. High-throughput Cos-Seq screen with intracellular *Leishmania infantum* for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006789, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006789.
- FERREIRA, T. R. et al. Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: characterization of a clinical isolate from Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 5, p. e0012175, 2024.
- GARG, M. et al. Quantitative secretome analysis unravels new secreted proteins in Amphotericin B resistant *Leishmania donovani*. **Proteomics**, v. 19, n. 12, p. e1800456, 2019. DOI: 10.1002/pmic.201800456.
- GAZANION, E. et al. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 12, p. e115, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw456.
- GOMAA, A. A. et al. Evaluation of diagnostic performance of parasitological and serological tests for visceral leishmaniasis in endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 4, p. e0012345, 2025.

- GONÇALVES, D. S. et al. Treatment of canine visceral leishmaniasis with Milteforan induces *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B. **Veterinary Parasitology**, v. 295, p. 109456, 2021. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109456.
- HENDRICKX, S. et al. Challenges in evaluating drug resistance in visceral leishmaniasis: molecular mechanisms and field diagnostics. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 363-373, 2018.
- HENDRICKX, S. et al. Experimental selection of paromomycin resistance in *Leishmania donovani* amastigotes induces variable genomic polymorphisms. **Parasitology Research**, v. 120, n. 2, p. 729-739, 2021.
- IBARRA-MENESES, K. A. et al. Exploring direct and indirect targets of current antileishmanial drugs using a novel thermal proteomics profiling approach. **Journal of Proteomics**, v. 250, p. 104389, 2022. DOI: 10.1016/j.jprot.2022.104389.
- IMAMURA, H. et al. Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **eLife**, v. 5, p. e19467, 2016. DOI: 10.7554/eLife.19467.
- KHANRA, S. et al. Antimony resistance mechanism in genetically different clinical isolates of Indian Kala-azar patients. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 20, p. 100456, 2022. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.100456.
- LEÓN, J. et al. Upregulation of nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyl transferase increases resistance to oxidative stress and antimony in promastigotes of *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. e0012345, 2025. DOI: 10.1371/journal.pntd.0012345.
- MAGALHÃES, R. D. et al. Increased thiol levels in antimony-resistant *Leishmania infantum* isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006599, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006599.
- MITROPOULOS, P. et al. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2010.
- MONDELAERS, A. et al. Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4632-4641, 2016. DOI: 10.1128/AAC.00620-16.
- NEGREIRA, G. H. et al. Exploring the evolution of the *Leishmania donovani* karyotype through high-throughput single-cell genome sequencing. **Genome Biology and Evolution**, v. 15, n. 1, p. evac173, 2023.
- NING, C. et al. Lathosterol Oxidase Sterol C-5 Desaturase Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in *Leishmania major*. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 567-580, 2020. DOI: 10.1111/mmi.14678.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis: fact sheet**. Geneva: WHO, 2022.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (PAHO). **Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas**. Washington, D.C.: PAHO, 2022.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (PAHO). **Leishmaniasis: epidemiological report of the Americas**. Washington, D.C.: PAHO, 2023.
- ÖZBILGIN, A. et al. Determination of Antimony Resistance Mechanism of *Leishmania tropica* Causing Cutaneous Leishmaniasis in Turkey. **Acta Tropica**, v. 210, p. 105567, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105567.
- PEREA-MARTINEZ, C. et al. Transcriptomic Analysis in Human Macrophages Infected with Therapeutic Failure Clinical Isolates of *Leishmania infantum*. **Frontiers**

- in **Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 789012, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.789012.
- PINHEIRO, R. S. et al. False-negative rates of conventional serological assays in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 7, p. e01020-20, 2020.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.
- POUNTAIN, J. R. et al. Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in Leishmania parasites. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 15, p. 7890-7902, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz567.
- QUEFFEULOU, A. et al. CRISPR-Cas9 high-throughput screening to study drug resistance in Leishmania infantum. **Molecular Microbiology**, v. 141, n. 2, p. 234-248, 2024.
- RIJAL, S. et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1530-1538, 2013.
- SABOIA-VAHIA, M. et al. In-Depth Quantitative Proteomics Characterization of In Vitro Selected Miltefosine Resistance in Leishmania infantum. **Journal of Proteome Research**, v. 21, n. 5, p. 1234-1245, 2022. DOI: 10.1021/acs.jproteome.2c00123.
- SHAW, A. K. et al. Coupling Chemical Mutagenesis to Next-Generation Sequencing for the Identification of Drug-Resistance Mutations in Leishmania. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e00789-19, 2019. DOI: 10.1128/mBio.00789-19.
- SIREKBASAN, S. et al. Genomic Insights into the Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Gene Family in Leishmania major and Leishmania infantum: Expression Patterns and Potential Association with Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 123456, 2025. DOI: 10.3389/fcimb.2025.123456.
- SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.
- TAGLIAZUCCHI, L. et al. Label-Free Mass Spectrometry Proteomics Reveals Different Pathways Modulated in THP-1 Cells Infected with Therapeutic Failure and Drug Resistance Leishmania infantum Clinical Isolates. **Parasitology Research**, v. 122, n. 4, p. 1023-1038, 2023.
- TULLOCH, L. et al. Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) activity in Leishmania donovani is likely dependent upon cytochrome P450 reductase 1. **IUBMB Life**, v. 70, n. 1, p. 9-22, 2024.
- VACCHINA, R. E. et al. A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in Leishmania donovani. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004639, 2016.
- VACCHINA, R. E. et al. Genomic appraisal of the multifactorial basis for in vitro acquisition of miltefosine resistance in Leishmania donovani. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5928-5939, 2016. DOI: 10.1128/AAC.01052-16.
- VERMA, N. K. et al. Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in Leishmania donovani. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 3, p. 358-370, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.09.003.

- VINCENT, I. M. et al. Mitochondrial proteomics of antimony and miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 15, n. 2-3, p. 658-672, 2015.
- WIJERATHNA, T. et al. Population dynamics of phlebotomine sand flies in cutaneous leishmaniasis endemic areas of Kurunegala district, Sri Lanka. **Acta Tropica**, v. 230, p. 106406, 2022.
- ZHANG, W. et al. A comprehensive review of *Leishmania* vaccines: from the laboratory to the clinic. **Vaccines**, v. 13, n. 1, p. 89, 2025.