

Susceptibilidade de isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* aos antimoniais: investigação da possível correlação entre falha terapêutica e resistência *in vitro*.

Palavras-Chave: Leishmaniose, Susceptibilidade, Antimônio.

Autores/as:

BEATRIZ TAINE DE MORAES [INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP]

BIANCA ALVES FERREIRA [INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP]

GUSTAVO HENRIQUE CORRÊA SOARES [INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - USP]

Prof. Dra. MAYARA INGRID SOUSA LIMA [DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - UFMA]

Prof. Dr. JOSÉ ANGELO LAULETTA LINDOSO [INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS]

Prof. Dr. ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO (orientador) [INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida através de um vetor flebotomíneo dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*. As leishmânias possuem duas formas distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota encontra-se no tubo digestório do inseto vetor, enquanto a forma amastigota, intracelular obrigatória, encontra-se no interior das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos (Burza, Croft et al., 2018). A LT pode se apresentar em três formas clínicas distintas: leishmaniose mucocutânea, cutânea localizada e cutânea difusa, sendo que essas duas últimas formas clínicas, podem ser causadas por *L. (Leishmania) amazonensis* no Brasil (Silveira, 2019).

A doença distribui-se em áreas tropicais e subtropicais, e no Brasil, cerca de 26 mil novos casos são reportados anualmente (Alvar, Velez et al. 2012). Dados epidemiológicos também mostram, que a incidência das leishmanioses tem aumentado consideravelmente em áreas urbanas do Brasil, o que indica um aumento da exposição geográfica do parasito. Um outro problema presente é a co-infecção da LT com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) que pode levar a apresentações atípicas de lesões, além de falhas no tratamento que têm sido reportadas em pacientes co-infectados (Goto and Lindoso 2010, Burza, Croft et al. 2018).

A primeira linha de tratamento no Brasil, baseia-se no uso do antimonial pentavalente (SbV), (Glucantime). Esse medicamento apresenta uma série de limitações como toxicidade, custo do tratamento e administração parenteral. Há ainda um outro problema representado pelos relatos de resistência clínica em áreas endêmicas a esse medicamento (Croft, Sundar et al. 2006). A segunda linha de tratamento se baseia no uso da anfotericina B, que é altamente tóxica (a forma lipossomal é menos tóxica, mas o custo do tratamento por paciente é bem elevado). Além da anfotericina B, a miltefosina, único fármaco oral disponível para a leishmanioses, foi aprovado para o tratamento da LT no Brasil em 2018.

Existem diversos mecanismos de resistência aos antimoniais já descritos em *Leishmania*, mas a maioria deles foi feito com linhagens resistentes selecionadas *in vitro* no laboratório. Pouco se conhece sobre a possível correlação entre a suscetibilidade *in vitro* ao SbV em isolados clínicos de espécies circulantes no Brasil e a resposta ao tratamento clínico dos pacientes. Neste caso, o fenótipo de suscetibilidade poderia ser um marcador para o monitoramento de linhagens resistentes do parasito, e conseqüentemente da eficácia ao tratamento.

Neste estudo pretendemos investigar a possível correlação entre a suscetibilidade *in vitro* e resposta ao tratamento clínico ao Glucantime, principal fármaco utilizado na quimioterapia da LT no Brasil. Este estudo poderá ser útil ainda para identificar potenciais isolados que possam emergir como cepas resistentes. Serão utilizados isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis* circulantes no Brasil, advindos de diferentes exposições como a de pacientes já tratados e que não responderam ao tratamento com SbV, pacientes não tratados, além de pacientes coinfectados pelo vírus HIV.

METODOLOGIA:

Isolados clínicos: No total serão avaliados sete isolados clínicos. Dois deles são provenientes de pacientes que foram tratados com SbV e que não responderam ao tratamento, sendo um deles proveniente de um paciente co-infectado com HIV. Ambos os isolados foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Mayara I. S. Lima da Universidade Federal do Maranhã (UFMA). Os demais isolados são provenientes de pacientes que ainda não haviam sido tratados, e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Angelo Lindoso do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). As cepas de *L. (L.) amazonensis* utilizadas neste estudo são as seguintes: M2269 (MHOM/BR/1973/M2269), PH8 (IFLA/BR/1967/PH8) e LV79 (MPRO/BR/1972/M1841) (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos isolados clínicos e das cepas de *L. (L.) amazonensis*.

Código do isolado	Forma clínica	Paciente já tratado?	Coinfecção pelo HIV?
M2269	-	-	-
PH8	-	-	-
LV79	-	-	-
ER054 ¹	LCL	Não	Não
ER117 ¹	LCL	Não	Não
ER118 ¹	LCL	Não	Não
ER256 ¹	LCL	Não	Não
UB017 ¹	LCL	Não	Não
AAB ^{2,3}	LCD	Sim	Sim
NSA ²	LCD	Sim	Não

¹ Isolados clínicos provenientes do IIER (Coser et al., 2021).

² Isolados clínicos provenientes da UFMA.

³ (Corrêa Soares, Santos da Silva et al. 2020)

As cepas de *L. (L.) amazonensis* utilizadas neste projeto de pesquisa estão destacadas em cinza na Tabela.

Cultivo dos isolados de *L. (L.) amazonensis*: A forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* será cultivada em meio M199 estéril, diluído em água destilada e complementado com HEPES 40 mM (pH 7,4), adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, 10% de soro fetal bovino inativado e estéril e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. As culturas serão mantidas em estufa a 25°C e os repiques de cada isolado serão realizados semanalmente (Kapler, Coburn et al. 1990).

Avaliação da suscetibilidade em promastigotas: Para verificar a susceptibilidade dos isolados, foi determinado os valores de EC₅₀ e o EC₉₀ (concentração de fármaco que inibe a viabilidade celular

em 50% e 90% respectivamente) nas formas promastigotas, através da técnica do MTT conforme previamente descrito (Coser et al., 2021). As cepas e os isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis*, foram incubados com concentrações crescentes de antimônio trivalente (SbIII) (0; 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250 μ M), em placas de 96 poços durante 24h. O antimônio pentavalente (SbV) é um pró-fármaco e precisa ser reduzido a SbIII para se tornar ativo. Essa redução só ocorre em macrófagos e em amastigotas, e é por isso que no ensaio de MTT utilizamos a forma trivalente do fármaco. Posteriormente a esse período, foi adicionado 30 μ L de solução de MTT por um período de 3 horas de incubação, sendo então interrompido o experimento com 50 μ L de SDS 20%. O resultado foi avaliado por espectrofotometria, medindo a absorbância de 595 nm, utilizando como referência a absorbância de 690 nm. Os experimentos estão sendo feitos em triplicatas e um total de pelo menos três experimentos independentes.

Avaliação da suscetibilidade em amastigotas: Para verificar a susceptibilidade dos isolados nas formas amastigotas, também foi determinado o valor de EC_{50} (Coser et al., 2021). Para obter as formas amastigotas intracelulares utilizamos macrófagos provenientes de medula óssea de fêmures de camundongos BALB/c. Após a extração dos macrófagos, a diferenciação foi obtida após 7 dias de incubação em meio R2020 em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os macrófagos foram então plaqueados em placas de 24 poços, infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento e encubados em estufa a 34°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 3 horas de infecção, foi adicionado concentrações crescentes de SbV (0; 100; 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000 μ M). Após seis dias de infecção, foi finalizado o experimento com lavagem com PBS e fixação com metanol. As placas foram então coradas com kit de coloração e coladas em lamínulas para posterior visualização em microscópio óptico. Os amastigotas intracelulares foram contados de um total de pelo menos 100 macrófagos infectados e a porcentagem de infecção para cada concentração de fármaco determinada.

Análise da suscetibilidade: Os valores de EC_{50} e EC_{90} foram calculados com o auxílio do programa GraphPad Prism 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suscetibilidade em promastigotas foi analisada em três isolados clínicos, ER117, ER054 e AAB e nas três cepas, M2269, PH8 e LV79 (Tabela 2). O EC_{50} das cepas variou de 18,42 \pm 0,41 a 25,30 \pm 5,96 μ M, já o EC_{50} dos isolados clínicos variou de 19,06 \pm 0,53 a 99,08 \pm 6,89 μ M (Tabela 2; Figura 1). Pode-se observar que a cepa M2269 foi mais suscetível e o isolado ER117 menos suscetível. Este isolado apresentou um valor de EC_{50} de cerca de cinco vezes maior que da cepa referência M2269.

Foi verificada uma significativa variação de suscetibilidade na forma promastigotas dos isolados clínicos. Os isolados ER117 e ER054 apresentaram os maiores valores de EC_{50} (Tabela 2). Esses achados demonstram que há uma grande variabilidade de suscetibilidade dentro dos isolados estudados, principalmente quando comparados com as cepas do parasito. Estes resultados precisam ainda ser avaliados na forma amastigota, mas já indica que esses dois isolados podem emergir como cepas resistentes.

A suscetibilidade em amastigotas foi analisada apenas isolado clínico AAB e na cepa referência M2269. O valor de EC_{50} encontrado para a cepa referência foi de 373,15 \pm 60,31 μ M e para o isolado foi de 1191 μ M. A porcentagem de infecção da cepa referência foi de 73%, enquanto no isolado foi de 90%. Ainda é necessário repetir este experimento, mas a partir destes resultados preliminares é possível prever que o isolado AAB possui uma infectividade maior *in vitro* que a

cepa referência M2269, e que o valor de EC₅₀ é cerca de três vezes maior (Tabela 2). Esses dados indicam que esse isolado possui baixa suscetibilidade ao tratamento de antimônio pentavalente *in vitro*, sugerindo que a falha terapêutica do paciente no qual o parasito foi isolado, pode ser decorrente da baixa suscetibilidade ao SbV. O isolado AAB foi isolado de um paciente que já havia sido tratado com Glucantime, e que apresentou falha ao tratamento.

Tabela 2. Suscetibilidade dos isolados clínicos e das cepas referências de *L. (L.) amazonensis*.

Código do isolado	Promastigota		N ¹	Amastigota			N ²
	EC ₅₀ ± DP SbIII (µM)	EC ₉₀ SbIII (µM)		EC ₅₀ ± DP SbV (µM)	EC ₉₀ SbV (µM)	Infecção (%)	
M2269	18,42 ± 0,41	36,18	3	373,15 ± 60,31	ND	73	2
PH8	24,16 ± 4,81	59,15	3	ND	ND	ND	ND
LV79	23,13 ± 1,33	65,25	3	ND	ND	ND	ND
ER054	87,63 ± 11,06	298,80	3	ND	ND	ND	ND
ER117	99,08 ± 6,89	350,50	3	ND	ND	ND	ND
AAB	19,06 ± 0,53	42,13	3	1191	ND	90	1

¹ Número de experimentos independentes realizados em triplicata por cepa ou isolado;

² Número de experimentos independentes realizados por cepa ou isolado.

SbIII - Antimônio trivalente

SbV - Antimônio pentavalente

ND - Não determinado

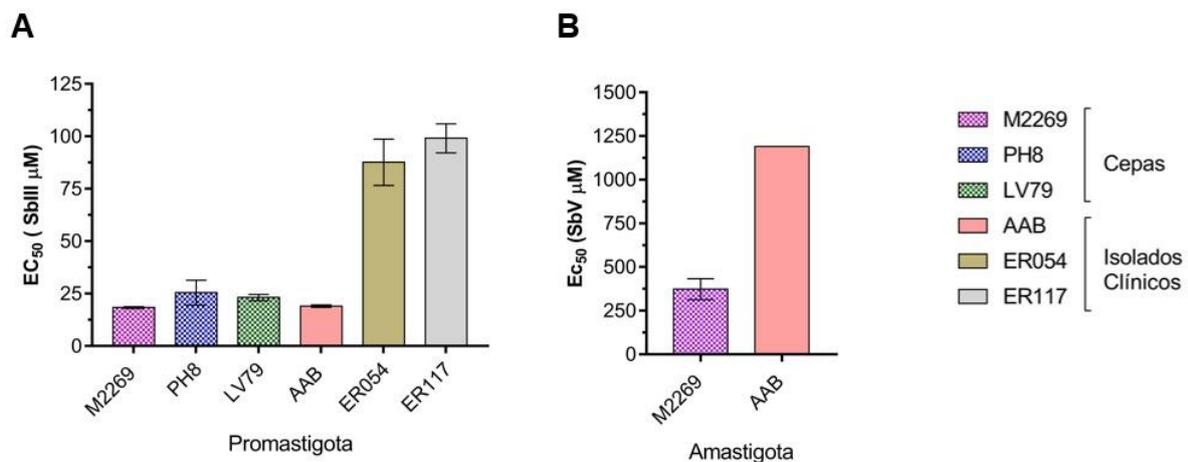


Figura 1. Suscetibilidade de cepas e isolados de *L. (L.) amazonensis* aos antimoniais. A - Valores de EC₅₀ na forma promastigota para o SbIII (antimônio trivalente). B - Valores de EC₅₀ na forma amastigota para o SbV.

PERSPECTIVAS

Posteriormente, pretendemos avaliar os outros isolados descritos no projeto, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota intracelular. Dados preliminares demonstram que os isolados ER117 e ER054 são resistentes ao SbIII. Os resultados deste projeto poderão contribuir para uma melhor compreensão da possível correlação entre a suscetibilidade *in vitro* e a resposta ao tratamento com o SbV na LT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAR, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer. "**Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.**" PLoS One 7(5): e35671, 2012.
- BURZA, S., S. L. Croft and M. Boelaert. "**Leishmaniasis.**" *Lancet*, 2018.
- CORRÊA Soares, G. H., A. B. Santos da Silva, L. Salomão de Sousa Ferreira, J. S. Ithamar, G. de Alencar Medeiros, S. R. Ferreira Pereira, M. I. Sousa Lima and E. S. d. A. C. de Maria Pedrozo. "**Case Report: Coinfection by Leishmania amazonensis and HIV in a Brazilian Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Patient.**" Am J Trop Med Hyg, 2020.
- CROFT, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb. "**Drug resistance in leishmaniasis.**" Clin Microbiol Rev 19(1): 111-126, 2006.
- COSER, E. M., Ferreira B. A., Yamashiro-Kanashiro E. H., Lindoso J. A. L., Coelho A. C. "**Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of Leishmania species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil.**" Acta tropica vol. 215, 2021.
- GOTO, H. and J. A. Lindoso. "**Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.**" Expert Rev Anti Infect Ther 8(4): 419-433, 2010.
- KAPLER, G. M., C. M. Coburn and S. M. Beverley. "**Stable transfection of the human parasite Leishmania major delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression.**" Mol Cell Biol 10(3): 1084-1094, 1990.
- SILVEIRA, F. T. "**What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniases so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil.**" Trans R Soc Trop Med Hyg, 2019.