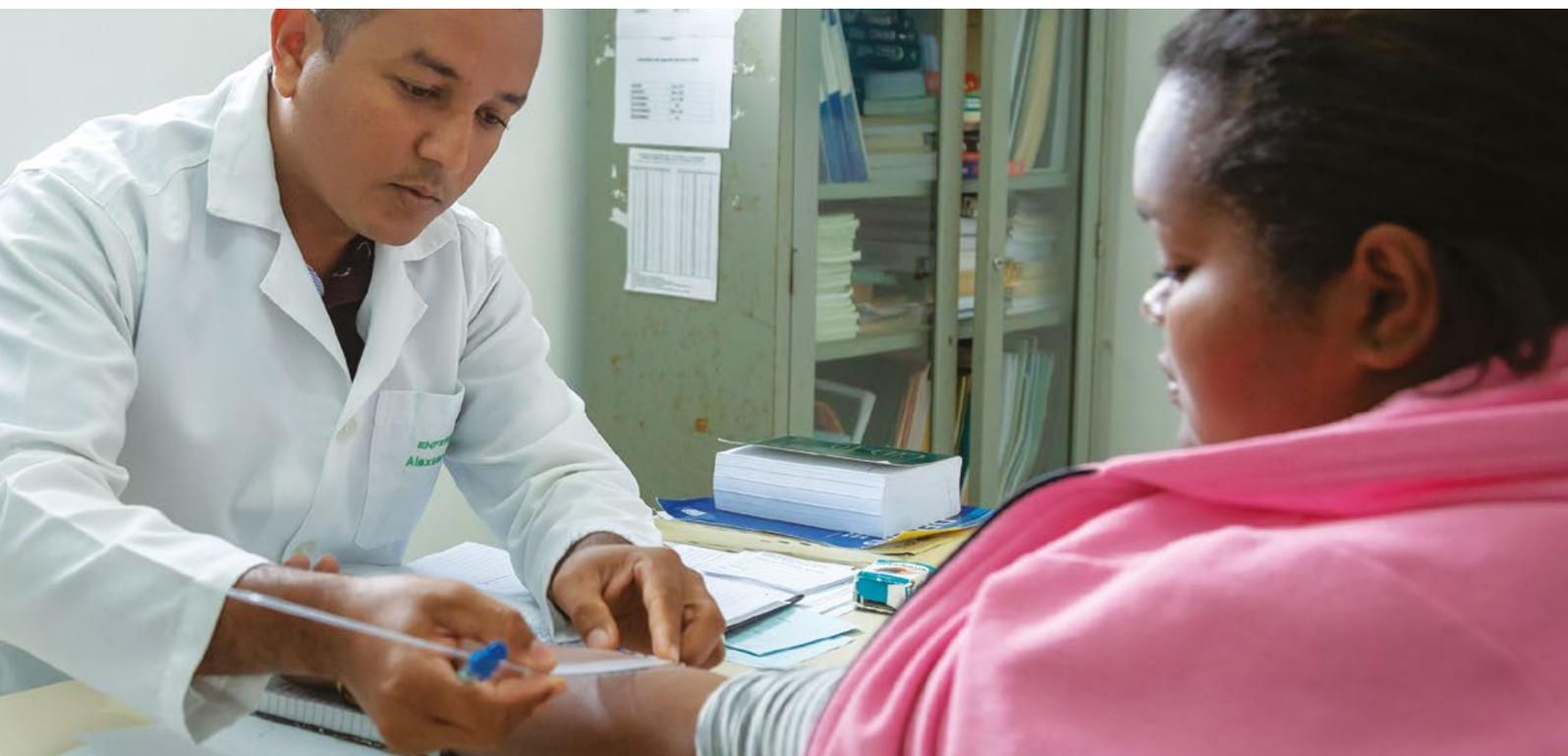


InfoLEISH

Boletim informativo da redeLEISH - 8ª edição

Maio de 2024



EDITORIAL - BYRON ARANA, DNDi

Há doze anos, a equipe de leishmaniose da DNDi embarcou em uma missão com paixão, comprometimento e esperança para encontrar tratamentos mais seguros e eficazes para a leishmaniose cutânea (LC). Como parte desse esforço e com o objetivo de promover a troca de informações, conhecimento e desenvolver atividades colaborativas, a redeLEISH foi criada há dez anos. Ao comemorarmos o décimo aniversário da redeLEISH, queremos expressar nossa gratidão pelo apoio, entusiasmo e dedicação de todos os seus membros e colaboradores que, direta ou indiretamente, contribuíram para alcançar nossos objetivos.

O desenvolvimento de novos tratamentos para a LC tem sido, de fato, uma jornada desafiadora, repleta de contratempos. Um dos principais desafios é a falta de financiamento atribuída, entre outros fatores, ao fato da doença não ser considerada fatal, deixando de lado outros problemas importantes causados

pela doença, como estigma, cicatrizes na pele, segregação, saúde mental etc., que afetam mais de um milhão de pessoas que sofrem de LC todos os anos. Apesar dessas dificuldades, houve progresso. Por exemplo, as intervenções existentes, como a termoterapia, agora estão disponíveis na maioria dos países latino-americanos, um esforço que foi liderado pela Organização Pan-Americana da Saúde com o apoio da Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas.

A tentativa de melhorar a eficácia das intervenções de tratamento atuais nos levou a avaliar a combinação de uma única aplicação de termoterapia com miltefosina oral por três semanas. Os resultados finais de um estudo de Fase III realizado em 6 instituições participantes da redeLEISH no Brasil, Bolívia, Panamá e Peru serão informados até o final de 2024.

Um desenvolvimento empolgante no campo das terapias direcionadas ao siste-

ma imunológico do hospedeiro é a transição do CpG D35 do desenvolvimento pré-clínico para o desenvolvimento clínico inicial. Em voluntários saudáveis, a administração do CpG D35 demonstrou ser segura e capaz de promover a resposta imunológica que tem sido associada ao controle da doença. Estamos avançando com um estudo de dose múltipla ascendente em pacientes com LC.

Olhando para o futuro, no último ano a equipe tem trabalhado para iniciar em 2025 um estudo de Fase II para avaliar a segurança e a eficácia de um novo composto oral desenvolvido pela Novartis, que em estudos em animais e *in vitro* demonstrou ser ativo contra as espécies de *Leishmania* que causam a LC.

No geral, tem sido uma jornada empolgante, com muitos motivos para não perder a esperança e continuar apoiando os esforços coordenados na busca de novos tratamentos para a leishmaniose cutânea. •



Sumário

01 EDITORIAL

02 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 (GSK3) COMO POTENCIAL TERAPIA ANTI-LEISHMANIA

06 INIBIÇÃO DO PROTEASSOMA DE CINETOPLASTÍDEOS, UMA NOVA OPORTUNIDADE DE TRATAMENTO PARA O MANEJO DA LEISHMANIOSE

08 ATI-1801 DA APPILI THERAPEUTICS: RUMO A UM TRATAMENTO SEGURO E EFICAZ PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

09 DIRETRIZES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NAS AMÉRICAS

13 AVANÇO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO PONTO DE ATENDIMENTO PARA DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS CUTÂNEAS

15 FORMALIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PORTADORES DE LEISHMANIOSE - ABRAPLEISH

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 (GSK3) COMO POTENCIAL TERAPIA ANTI-LEISHMANIA



PRISCILA Z. RAMOS, KATLIN B. MASSIRER, GABRIELA BARREIRO e CAROLINA M. C. CATTAPRETA, Centro de Química Medicinal (CQMED), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Brasil, **TANIRIS C. BRAGA**, Centro de Química Medicinal (CQMED), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, Brasil/Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil, **JULIANA I. AOKI**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil/Instituto de Biologia, UNICAMP, Brasil, **JÚLIA L. MONTEIRO, VITOR M. ALMEIDA e CARINE C. DREWES**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil, **ADRIANO C. COELHO**, Instituto de Biologia, UNICAMP, Brasil, **JADEL M. KRATZ e LUIZA CRUZ**, DNDi América Latina, Brasil, **RONALDO A. PILLI**, Instituto de Química, UNICAMP, Brasil, **RAFAEL M. COUÑAGO**, Eurofarma Laboratórios S/A, Brasil/Consórcio de Genômica Estrutural, Escola de Farmácia UNC Eshelman, Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, EUA

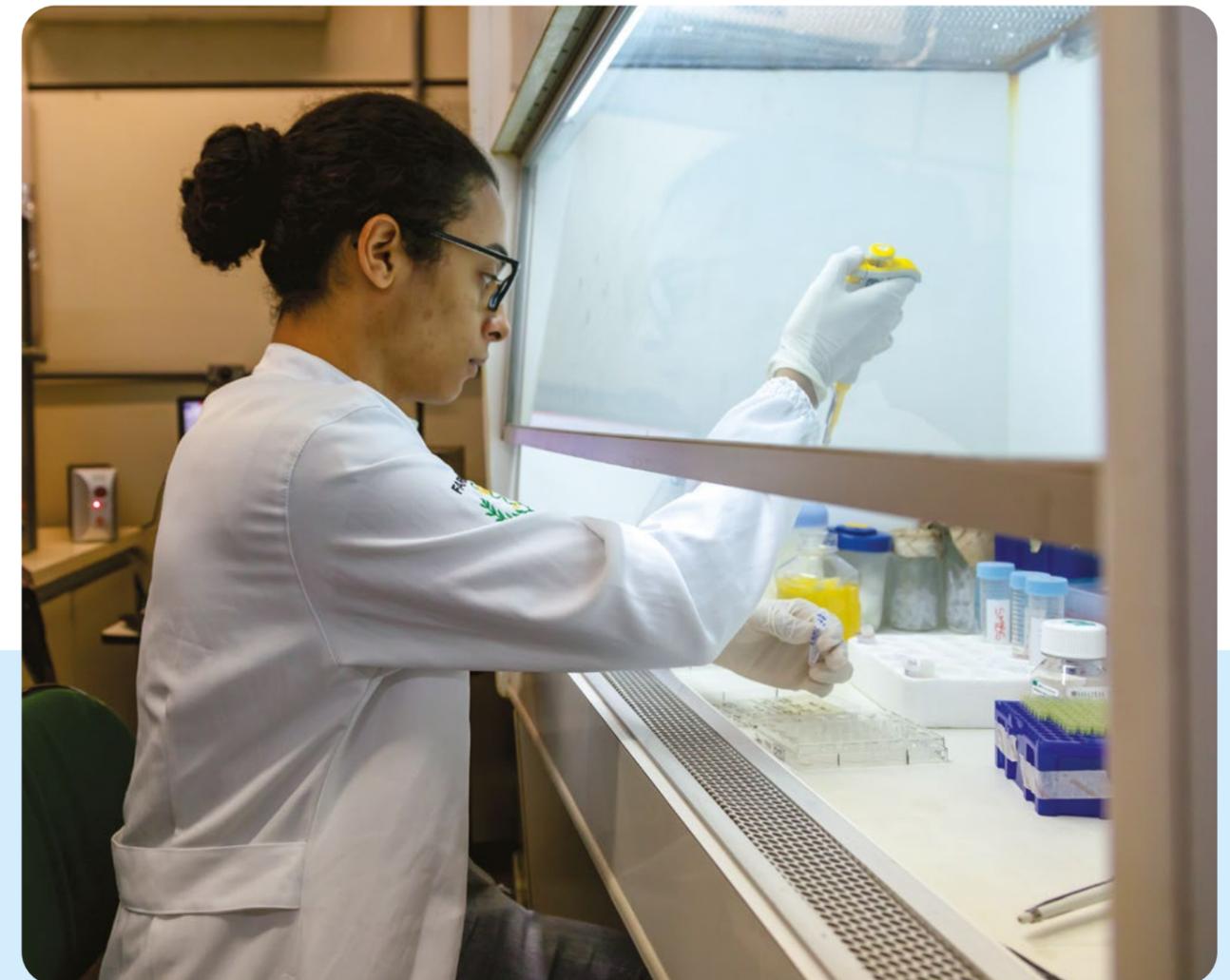
Ao longo das últimas décadas, houve muito progresso no tratamento da leishmaniose, levando a resultados aprimorados e a uma melhor compreensão da doença. Todavia, os tratamentos atuais ainda apresentam problemas como toxicidade, altos custos, surgimento de resis-

tência a medicamentos, longa duração e eficácia limitada.

Estes desafios enfatizam a necessidade de pesquisas contínuas em estratégias de descoberta de fármacos baseadas em alvos moleculares. Essas estratégias focam na identificação de

vias biológicas específicas ou proteínas cruciais para a sobrevivência e virulência do parasita, com o potencial de desenvolver opções terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas.

Para explorar o uso de estratégias baseadas em alvos e identificar potenciais alvos



terapêuticos para a leishmaniose, nós estabelecemos um consórcio multidisciplinar abrangendo pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o Centro de Química Medicinal da UNICAMP (CQMED), DNDi e Eurofarma. Esta iniciativa, denominada Leish-SB-DD, conta com a expertise de mais de 20 pesquisadores e recebe suporte financeiro público e privado.

Apesar do sucesso em várias áreas clínicas, as abordagens baseadas em alvos ainda não produziram medicamentos para leishmaniose e outras doenças causadas por parasitas eucarióticos, como a doença de Chagas e a malária. Um desafio significativo na aplicação de

estratégias baseadas em alvos a protozoários parasitas surge de uma falta de conhecimento geral sobre a biologia complexa destes organismos. Esta lacuna de conhecimento se deve, em parte, à disponibilidade limitada de ferramentas moleculares e químicas necessárias para identificar proteínas ou processos biológicos cruciais para a sobrevivência dos parasitas no hospedeiro humano. Estas proteínas essenciais, uma vez identificadas, poderiam servir como alvos ideais para terapias inovadoras.

A recente implementação da tecnologia CRISPR-Cas9 para edição gênica em *Leishmania* possibilitou que pesquisadores identificassem genes essenciais

para a diferenciação e sobrevivência do parasita. Isso levou à identificação de vários genes de *Leishmania* que codificam proteínas quinases que desempenham um papel crucial na sobrevivência do parasita em um hospedeiro mamífero¹. Proteínas quinases atuam como os principais reguladores de cascatas de sinalização celular, controlando processos como proliferação e morte celular. Consequentemente, elas têm sido amplamente exploradas como alvos terapêuticos para várias doenças humanas. Esta descoberta abriu caminho para aproveitar o vasto conjunto de ferramentas de química medicinal disponíveis para proteínas quinases humanas na descoberta de medicamentos para *Leishmania*. »

Referências

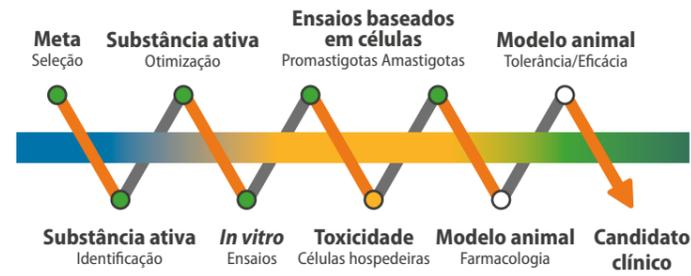
1. Baker, N., Catta-Preta, C.M.C, Neish, R. et al. Systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1244, 2021.





SBDD-Leish

Pipeline de descoberta de fármacos baseada na estrutura



Cascata de ensaios:

1,400 inibidores de quinase

ensaios de enzimas

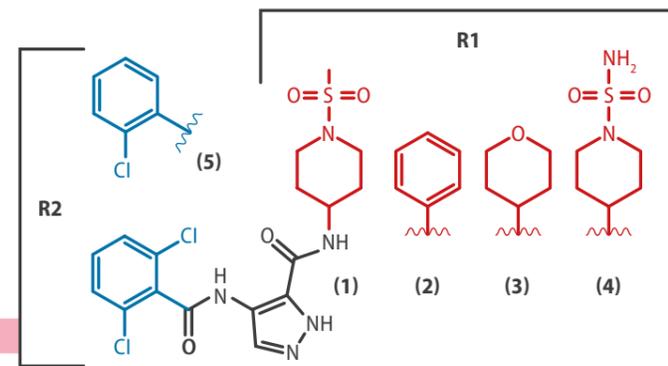
Substâncias priorizadas

ensaios baseados em células
propriedades químicas

Substância 1

ciclos iterativos de projeto, criação, teste
e análise (DMTA) baseados na estrutura

Substâncias otimizadas 2-5



Atividade da substância:

	Enzima purificada <i>in vitro</i> (K_i - μM)*		Ensaios baseados em células (EC_{50} - μM)*			
	<i>LinfGSK3α</i>	<i>LinfGSK3β</i>	Promastigotas de vida livre	Toxicidade - macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de camundongos	BMDM de camundongos-amastigotas internalizados	Índice de Seletividade (SI)*
1	3×10^{-5}	2×10^{-5}	3×10^{-1}	8	1	8
2	>1	2×10^{-4}	3	52	3	17
3	5×10^{-1}	2×10^{-5}	5×10^{-2}	12	2	6
4	2×10^{-5}	2×10^{-5}	5×10^{-1}	17	1	17
5	1×10^{-5}	5×10^{-5}	9×10^{-2}	19	1	19
Miltefosina	Não testado	Não testado	17	76	2	38

* K_i - constante inibitória; EC_{50} - meia concentração máxima efetiva; SI - Índice de Seletividade é calculado dividindo-se os valores de EC_{50} de uma substância obtidos em macrófagos hospedeiros pelos valores obtidos para amastigotas internalizados em macrófagos.

Figura 1 – O consórcio SBDD-Leish identificou inibidores promissores de GSK3 que exibem atividade anti-*Leishmania* comparável à miltefosina, um medicamento aprovado para leishmaniose visceral.



Nosso consórcio SBDD-Leish escolheu investigar o potencial terapêutico de duas quinases identificadas como essenciais em estudos genéticos: glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta de *Leishmania infantum* (*LinfGSK3 α* e *LinfGSK3 β*), o agente causador de leishmaniose visceral na América Latina. Evidência adicional suportando *LinfGSK3 β* como um alvo terapêutico promissor foi fornecida por Xingi e colaboradores, que demonstraram que inibidores desta enzima foram ativos contra o parasita em cultura². Um dos desafios no desenvolvimento de inibidores para quinases de parasitas é o potencial para esses compostos também inibirem quinases do hospedeiro humano, resultando em efeitos tóxicos. Portanto, o objetivo principal do nosso projeto foi desenvolver inibidores de GSK3 de *L. infantum* que fossem eficazes contra o parasita, mas permanecessem inofensivos para as células humanas. Nós utilizamos a miltefosina, um medicamento aprovado clinicamente para o tratamento da leishmaniose visceral, como referência para avaliar a atividade anti-*Leishmania* e a toxicidade para as células hospedeiras de nossos compostos inovadores.

Para alcançar esse objetivo, nosso consórcio desenvolveu os reagentes e ensaios necessários para dar suporte à plataforma de descoberta de medicamentos baseada em alvos (Figura 1). Este trabalho envolveu a produção de *LinfGSK3 α* e *LinfGSK3 β* recombinantes para desenvolver ensaios *in vi-*

tro e avaliar a atividade de potenciais inibidores destas enzimas. Adicionalmente, nós determinamos a estrutura cristalina de *LinfGSK3 β* ligada a inibidores de quinase por cristalografia de raios-X, a fim de obter uma compreensão detalhada sobre interação entre a enzima e seus inibidores. Nós também estabelecemos ensaios celulares para avaliar o impacto dos compostos sobre a viabilidade de *L. infantum*, tanto em promastigotas quanto em amastigotas intracelulares clinicamente relevantes, utilizando macrófagos derivados da medula óssea de camundongo (do inglês: *bone-marrow derived mouse macrophages* - BMDM) como células hospedeiras. Por fim, nós organizamos uma coleção de 1400 inibidores de quinase com potencial de exibir atividade contra *LinfGSK3 α* e *LinfGSK3 β* .

De fato, a triagem da nossa coleção focada em quinases identificou vários inibidores potentes de *LinfGSK3 α* e *LinfGSK3 β* . Estes inibidores foram posteriormente avaliados em ensaios celulares utilizando promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Os resultados dos ensaios enzimáticos e fenotípicos, juntamente com uma avaliação das propriedades físico-químicas dos compostos ativos, orientaram nossa seleção do composto pirazolocarboximida **1** como ponto de partida para um programa de química medicinal com o objetivo de aumentar sua potência contra *LinfGSK3 α* e *LinfGSK3 β* , bem como sua atividade anti-*Leishmania* contra as formas amastigotas intracelu-

lares de *L. infantum*, reduzindo ao mesmo tempo sua toxicidade para células hospedeiras de mamíferos.

Nossos químicos medicinais utilizaram a estrutura cristalina de *LinfGSK3 β* para obter uma compreensão mais profunda de sua interação com os compostos pirazolocarboximida. Em seguida, eles planejaram modificações no composto **1** com o objetivo de aumentar sua atividade e propriedades farmacológicas. Iniciaram-se então ciclos iterativos de Planejamento-Síntese-Teste-Avaliação, abrangendo o teste de 35 novas moléculas contra quinases de *Leishmania in vitro*, bem como contra o parasita e as células hospedeiras de mamíferos em cultura.

Estes esforços resultaram na descoberta de compostos otimizados (**2-5**) que foram mais potentes contra as enzimas purificadas e, mais importante ainda, até duas vezes mais ativos em amastigotas intracelulares de *L. infantum* do que a miltefosina. No entanto, estes compostos foram mais tóxicos para células hospedeiras de mamíferos do que a miltefosina, conforme demonstrado pelo seu Índice de Seletividade (do inglês: *Selective Index* - SI).

Embora nosso avanço tenha se mostrado promissor, ainda há mais trabalho pela frente. Nossos próximos passos se concentrarão na avaliação contínua e no aprimoramento das propriedades farmacológicas de nossos compostos, bem como na obtenção de uma melhor compreensão da sua toxicidade potencial para células hospedeiras de mamíferos. •

Referências

- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V. et al. 6-Br-5methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 12, p. 1289–1303, 2009.



INIBIÇÃO DO PROTEASSOMA DE CINETOPLASTÍDEOS, UMA NOVA OPORTUNIDADE DE TRATAMENTO PARA O MANEJO DA LEISHMANIOSE

GERHILD ANGYALOSI, NATASHA HOCHBERG e SRINIVASA P S RAO, Novartis e BYRON ARANA, DNDi



Entre as doenças tropicais negligenciadas (DTNs), a leishmaniose – com todas as suas formas clínicas: visceral, cutânea e muco-cutânea – é uma doença devastadora para os pacientes e representa uma carga significativa para os sistemas de saúde já sobrecarregados. O roteiro da Organização Mundial da Saúde (OMS) para doenças tropicais negligenciadas 2021-2030, por meio de sua estrutura estratégica para controle e gerenciamento integrados de doenças tropicais negligenciadas cutâneas, definiu metas e estratégias específicas para o controle da leishmaniose cutânea (LC) em todo o mundo. Além de melhorar a detecção, o diagnóstico clínico, a notificação e o tratamento dos casos detectados de LC nos países endêmicos, uma das principais ações identificadas é o desenvolvimento de novos tratamentos orais ou tópicos para serem usados na atenção primária à saúde.

A DNDi e seus parceiros estão colaborando para identificar e promover o desenvolvimento de tratamentos seguros, eficazes e acessíveis para pessoas com doenças negligenciadas, incluindo a leishmaniose e a doença de Chagas. O LXE408 é um novo composto, descoberto na Novartis com o apoio financeiro da Wellcome (Khare *et al.* 2016). O LXE408 é o primeiro inibidor seletivo do proteassoma de cineto-

plastídeos da categoria, um candidato a medicamento em potencial para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea e também da doença de Chagas (Khare *et al.* 2016).

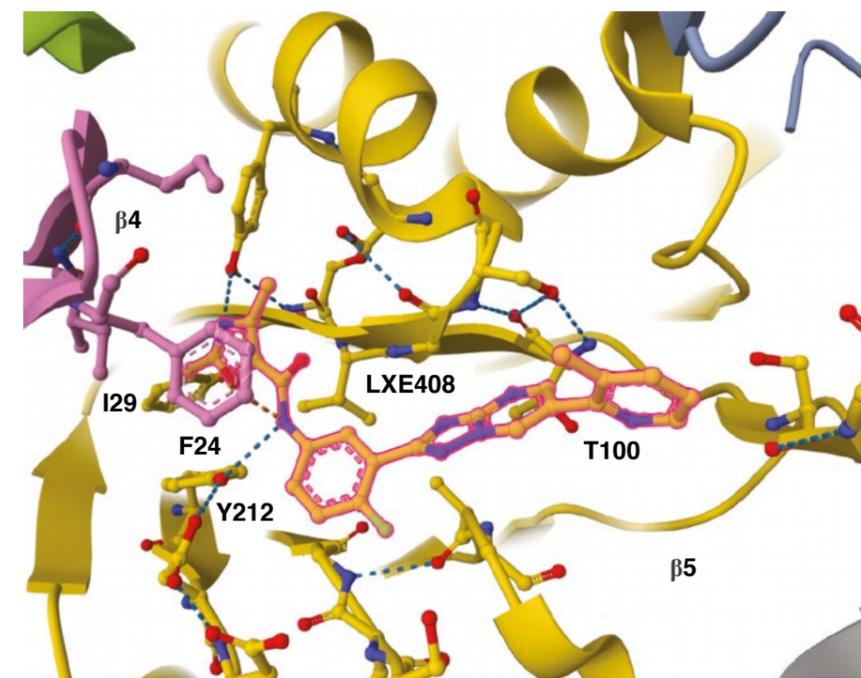
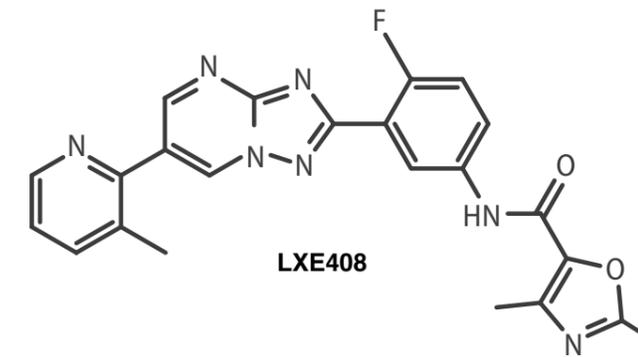
Em modelos pré-clínicos *in vitro*, o LXE408 demonstrou ser altamente seletivo para a inibição da atividade quimotripsina-símile do proteassoma 20S de cinetoplastídeos e é potente contra todas as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* testadas. Ao inibir a atividade quimotripsina-símile, o LXE408 interage seletivamente com subunidades altamente conservadas do proteassoma 20S dos cinetoplastídeos (subunidades b4 e b5) e não inibe o proteassoma 20S humano. Portanto, o LXE408 tem o potencial de ser seguro e eficaz em uma grande variedade de *Leishmania sp.*, incluindo *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis*. Além disso, o LXE408 é eficaz em vários modelos *in vivo*, incluindo leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea do Velho Mundo: modelo de LV (*L. donovani*) em camundongo, modelo de supressão de lesão em camundongo (*L. major*), modelo de cura de lesão em camundongo (*L. major*) (Nagle *et al.* 2020).

As evidências de segurança de um estudo de Fase 1 de dose múltipla ascendente em voluntários saudáveis apoiam a continuação do LXE408 para a Fase 2

(Segal, 2022). Atualmente, o LXE408 está sendo avaliado em ensaios clínicos de Fase 2 para a leishmaniose visceral (kala-azar) na Índia (clinicaltrials.gov NCT05593666) e na Etiópia (clinicaltrials.gov NCT05957978), com resultados previstos para 2025. O LXE408 tem o potencial de ser um novo medicamento oral para o tratamento da LC em todas as áreas endêmicas, contribuindo para o arsenal terapêutico existente contra essa doença debilitante. Com base na experiência adquirida com os estudos em LV, a DNDi e a Novartis estão colaborando para avançar o desenvolvimento do LXE408 também para a leishmaniose cutânea.

Em uma doença complexa como a LC, com uma heterogeneidade substancial de manifestações clínicas e grande diversidade de parasitas, o desenvolvimento de metodologias harmonizadas de ensaios clínicos é fundamental (Olliaro *et al.* 2018). A rede de pesquisa clínica da redeLeish é um recurso valioso com capacidade de avaliação clínica em diversos locais. Aproveitando a experiência científica e as plataformas de pesquisa existentes, o desenvolvimento bem-sucedido de um novo recurso promissor se beneficiará ainda mais de uma abordagem colaborativa integrada de todas as partes interessadas com parcerias inovadoras entre os setores público e privado. •

Estrutura de crio-EM em alta resolução do proteassoma 20S de *L. tarentolae* em complexo com LXE408



Referências

- Khare S, Nagle AS, Biggart A, *et al.* (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*; 537(7619):229-233.
- Nagle AS, Biggart A, Be C, *et al.* (2020) Discovery and characterization of clinical candidate LXE408 as a kinetoplastid-selective proteasome inhibitor for the treatment of leishmaniasis. *J Med Chem* 1021/acs.jmedchem.0c00499
- Olliaro P, Grogl M, Boni M. *et al.* (2018) Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation *PLoS Negl Trop Dis* 12(1): e0006141. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006141>
- Segal F, *et al.* Oral presentation at WorldLeish7, Cartagena, Colombia, August 2, 2022
- A Phase II, Multicentre, Randomized, Two-arm Blinded Study to Assess the Efficacy and Safety of Two LXE408 Regimens for Treatment of Patients With Primary Visceral Leishmaniasis. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05593666> (accessed 29 Jan 2024).
- LXE408 for Treatment of Visceral Leishmaniasis in Ethiopia, a Proof of Concept Study. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05957978> (accessed 29 Jan 2024).



ATI-1801 DA APPILI THERAPEUTICS: RUMO A UM TRATAMENTO SEGURO E EFICAZ PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

DONALD CILLA, GARY NABORS, CARL GELHAUS, ARTHUR BARON e JETSUDA AREEPHONG, Appili Therapeutics Inc e MENA ABDEL-NOUR, Appili Therapeutics Inc e Bloom Burton & Co



A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose, afetando centenas de milhares de pessoas em todo o mundo. A LC causa lesões cutâneas dolorosas que podem persistir por meses ou anos e está associada a um estigma social significativo devido às cicatrizes e desfigurações que ocorrem com frequência por causa da doença. Infelizmente, as terapias atuais para o tratamento da LC, embora moderadamente eficazes, são invasivas, tóxicas e podem exigir hospitalização para administração. Além disso, os principais tratamentos da LC são injetáveis, incluindo a anfotericina B e os antimoniais pentavalentes, que são dolorosos quando administrados, e a miltefosina oral, cujo alto custo impede o acesso aos pacientes que precisam dela nos países em desenvolvimento.

Está claro que tratamentos mais seguros e mais fáceis de administrar são necessários para a LC. Uma solução

simples é um creme tópico que poderia reduzir a exposição sistêmica ao medicamento e, ao mesmo tempo, tratar diretamente as lesões da LC. Os cremes tópicos têm o duplo benefício de limitar o potencial de toxicidade e são passíveis de autoadministração, em vez de exigir injeções diárias administradas por profissionais de saúde treinados.

A Appili Therapeutics está trabalhando para levar uma dessas soluções, um creme tópico de paromomicina (ATI-1801), para pacientes com LC. A Appili adquiriu o ATI-1801 da U.S. Army Medical Materiel Development Activity (USAMMDA) em 2019. No momento da aquisição, a USAMMDA havia concluído um programa completo de desenvolvimento clínico que incluía estudos de segurança de Fase 1, demonstrando tolerabilidade, e estudos de eficácia de Fase 2 na Colômbia, França e Tunísia, que demonstraram superioridade em relação ao placebo. Estudos adicionais de Fase 2 realizados no Peru e no Panamá demonstraram que o ATI-1801 tinha eficácia comparável a um creme combinado de paromomicina e gentamicina. Estudos de eficácia de Fase 3 foram conduzidos com 399 pacientes no Panamá e 375 pacientes na Tunísia e demonstraram uma taxa de cura clínica de 77,8% e 82%, respectivamente. Esses estudos sugeriram que o ATI-1801 seria eficaz no tratamento da LC tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo.

O objetivo da Appili é facilitar o amplo acesso ao ATI-1801 para pacientes com leishmaniose cutânea em todo o mundo. Estamos planejando trabalhar com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para incluir o ATI-1801 para distribuição nos países endêmicos que têm maior necessidade, usando o programa de Pré-Qualificação de Medicamentos Essenciais da OMS. Este processo é mais fácil para produtos que foram aprovados por autoridades regulatórias rigorosas, como a FDA.

A Appili identificou um novo fabricante para o ATI-1801 e está em processo de transferência da tecnologia para ele. Como há um novo fabricante, a Appili está trabalhando com a FDA para demonstrar a consistência do produto em relação ao fabricante anterior. Isso pode envolver experimentos *in vitro* e/ou estudos clínicos para qualificar o novo fabricante. Em todos os cenários, a Appili está buscando parcerias e fontes de financiamento para apoiar o desenvolvimento avançado do produto.

Assim que o ATI-1801 for aprovado pela FDA, a Appili trabalhará com a OMS para distribuí-lo em áreas endêmicas de leishmaniose cutânea em parceria com ONGs, ministérios da saúde locais e empresas farmacêuticas, proporcionando assim um tratamento seguro e eficaz para a leishmaniose cutânea a aqueles que precisam dele. •

DIRETRIZES LABORATORIAIS PARA DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NAS AMÉRICAS

OTACILIO C. MOREIRA, Plataforma de Análises Moleculares, Laboratório de Virologia e Parasitologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, ANA NILCE SILVEIRA ELKHOURY, Organização Pan-Americana da Saúde, Rio de Janeiro, Brasil e ELISA CUPOLILLO, Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil



A leishmaniose cutânea (LC) configura-se como a manifestação mais prevalente das leishmanioses, apresentando um polimorfismo clínico que varia desde a presença de pápulas até múltiplas úlceras que impactam tanto a pele quanto as mucosas, resultando em cicatrizes permanentes e sérias incapacidades. Esta doença, marcada por sua natureza desfigurante e estigmatizante, frequentemente provoca um impacto psicossocial e econômico nas comunidades que são afetadas.

Em 2022 foram reportados mais de 35.000 casos de LC nas Américas, sendo que mais de 60% dos casos estão concentrados no Brasil, Colômbia e Peru. Apesar de uma tendência de redução no número de casos nos últimos

20 anos, em 2022 houve um aumento na incidência da doença em relação ao ano anterior (OPAS, 2023).

O diagnóstico emerge como um dos desafios primordiais para o controle efetivo da doença enquanto problema de saúde pública. A disponibilidade de ferramentas diagnósticas para LC torna-se crucial para atingir as metas delineadas no Roteiro da OMS para Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) de 2021 a 2030, que preconiza a detecção de 85% dos casos de LC, seguida pelo tratamento de 95% dos casos reportados (WHO, 2020).

Em 2022, houve uma melhora no diagnóstico da LC e da leishmaniose mucosa na região das Américas, com 86,2% dos

casos sendo diagnosticados por métodos laboratoriais, representando 7% a mais do que o ano anterior (OPAS, 2023). Neste contexto, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) está liderando uma iniciativa que abrange centros de pesquisa de diversos países da região onde a LC é endêmica. O propósito é desenvolver uma abordagem consensual, padronizada e validada para o diagnóstico parasitológico da doença por meio da técnica de qPCR, superando a baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos disponíveis e contribuindo para que os diversos países das Américas melhorem sua capacidade e ampliem o diagnóstico laboratorial da doença. O projeto envolve a colaboração de sete grupos, originários da Argentina, Bolívia, México, Panamá, Peru e dois do Brasil. »



Reunião com especialistas:
Definição da qPCR como abordagem para melhorar o diagnóstico da leishmaniose cutânea nas Américas

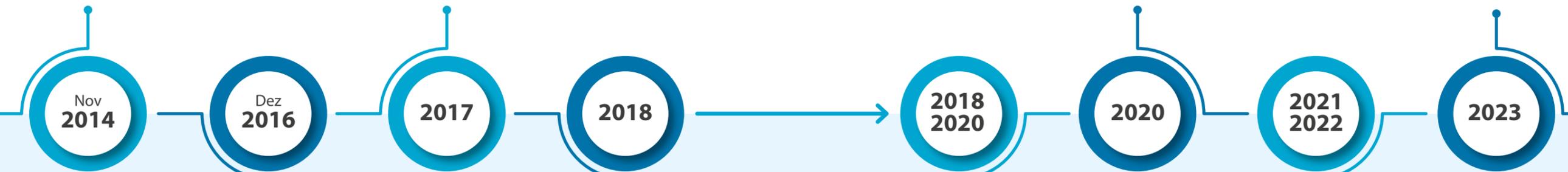
Planejamento de atividades e padronização de ensaios moleculares

Transporte das amostras para o Laboratório Central (Fiocruz-RJ) e início da validação multicêntrica dos ensaios qPCR

Análise final dos resultados e estabelecimento da metodologia consenso para o diagnóstico molecular da leishmaniose cutânea nas Américas

II Oficina Internacional sobre Padronização de um ensaio PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária para o manejo da leishmaniose cutânea nas Américas: Fiocruz, RJ

Criação de painel de amostras, envio para todos os laboratórios participantes e retorno dos resultados



Nov 2014

Dez 2016

2017

2018

2018 2020

2020

2021 2022

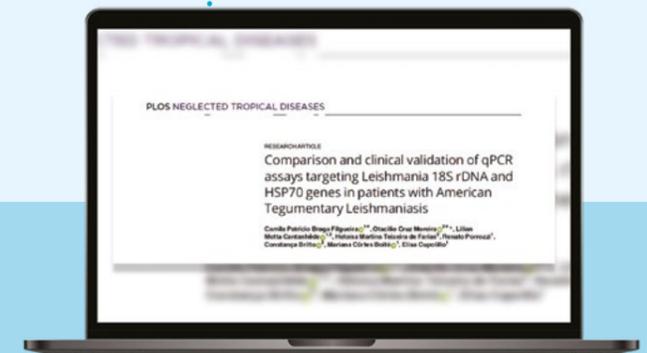
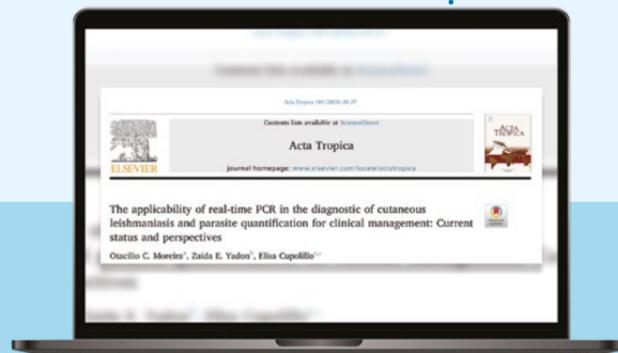
2023

I Oficina Internacional sobre Padronização de um ensaio PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária para o manejo da leishmaniose cutânea nas Américas: Universidade de Antioquia, Medellín - Colômbia

Revisão dos métodos moleculares utilizados como ferramentas para o diagnóstico da leishmaniose cutânea

Submissão/Aprovação do Projeto ao Comitê de Ética PAHOERC e comitês locais

Validação analítica e validação clínica preliminar da qPCR 18SrDNA e da qPCRHSP70 para o diagnóstico da leishmaniose cutânea





Desde que foi demonstrada a eficácia da PCR no diagnóstico da LC, diversas abordagens metodológicas foram sugeridas e experimentadas, tanto com PCR convencional (cPCR) quanto com PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Contudo, esta é a primeira iniciativa de padronização e validação de uma metodologia específica para o diagnóstico da doença, o que permite a definição de um consenso quanto a protocolos e alvos moleculares que possam ser empregados de maneira aprimorada no suporte ao diagnóstico clínico.

A padronização dos ensaios de qPCR foi realizada pela Fiocruz, Rio de Janeiro (Laboratório Central), utilizando DNA extraído de promastigotas de diversas espécies de *Leishmania*, seguido por uma validação clínica preliminar. Esta validação foi conduzida a partir de amostras coletadas de pacientes com suspeita clínica de LC, com confirmação ou não do diagnóstico parasitológico. Realizaram-se ensaios de qPCR multiplex direcionados a RNase P humana (controle interno endógeno), 18S rDNA e hsp70 no parasito. Observou-se uma correlação significativa na quantificação de parasitas entre os dois alvos empregados. Ao considerar o exame microscópico como referência padrão para o diagnóstico parasitológico, os resultados dos dois ensaios de qPCR simultâneos apresentaram uma sensibilidade de 98,5%. Além disso, ao analisar sequencialmente os resultados da qPCR para 18S rDNA e, posteriormente, a qPCR para hsp70, obteve-se a máxima especificidade (100%) (Filgueira *et al.*, 2020).

A etapa seguinte foi a de validação clínica multicêntrica usando a metodologia padronizada para três alvos de *Leishmania* spp: hsp70, 18SrDNA e kDNA. Pelo menos quinze amostras de lesões cutâneas

de pacientes com LC foram coletadas por cada um dos laboratórios participantes, totalizando 128 amostras. O DNA de cada amostra foi extraído em condições padronizadas, utilizando um controle interno exógeno, e enviado às cegas ao Laboratório Central, onde foi submetido aos ensaios de qPCR. Os resultados demonstraram uma positividade que variou de 67-100% e 80-100% para os alvos hsp70 e 18SrDNA, respectivamente. Os ensaios para kDNA mostraram positividade de aproximadamente 30% para as amostras do México, o que levantou algumas possibilidades que indicam a limitação do uso desse alvo para toda a região, devido à heterogeneidade deste alvo entre espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. A melhor sensibilidade foi obtida pelo alvo 18SrDNA, sendo esta considerada quase perfeita. Uma especificidade de 100% foi obtida para esse alvo e também para o hsp70. Observou-se queda na positividade da qPCR para amostras com Ct para RNase P a partir de 28, indicando que, além de funcionar como um controle endógeno da reação, o resultado para RNase P permite uma melhor interpretação dos resultados obtidos para os alvos de *Leishmania* spp.

Em seguida foi construído um painel de 68 amostras, a partir das amostras remetidas pelos diversos grupos participantes e amostras de referência, que foi enviado às cegas para cada grupo realizar os ensaios. Os resultados indicaram uma boa reprodutibilidade em comparação aos resultados obtidos pelo Laboratório Central. De uma forma geral, houve uma boa correlação e concordância entre a carga parasitária determinada pelo Laboratório Central e pelos outros laboratórios participantes.

Após um esforço de nove anos, os resultados foram apresentados e discuti-

dos durante a II Oficina Internacional de Ensaios de PCR em Tempo Real para o Diagnóstico Molecular e Quantificação da Carga Parasitária para o Manejo da Leishmaniose Cutânea nas Américas, com a presença de especialistas dos seis países participantes da iniciativa. Todos tiveram a oportunidade de realizar os protocolos durante o workshop para que todas as dúvidas pudessem ser esclarecidas. Ao final, tendo em conta o conjunto de resultados obtidos, o grupo considerou de forma unânime que o protocolo de qPCR tendo como alvo a região 18SrDNA de *Leishmania* spp deve ser empregado no diagnóstico molecular da LC. Além disso, outros estudos indicam que esse protocolo pode ser aplicado no diagnóstico das diversas manifestações clínicas da LC e pode ser uma importante ferramenta para o diagnóstico da LM.

Para conclusão do estudo, amostras de lesões cutâneas de outras etiologias estão sendo avaliadas para melhorar a avaliação da especificidade dos testes. Os resultados estão sendo organizados para divulgação por meio de publicação científica. Por ser a única metodologia validada para o diagnóstico molecular da LC nas Américas, um relatório técnico com a metodologia detalhada foi elaborado para que seja disponibilizado aos laboratórios nacionais e assim o protocolo possa ser incorporado ao fluxo de diagnóstico laboratorial da LC nos diferentes países da região.

Todas as atividades científicas e técnicas estão sendo coordenadas pelo Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses e a Plataforma de Análises Moleculares - Laboratório de Virologia e Parasitologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, com o apoio da OPAS e a DNDi. •

Referências

Pan American Health Organization. Leishmaniases: Epidemiological Report on the Region of the Americas. No. 12, December 2023. Washington, D.C.: OPS; 2023. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

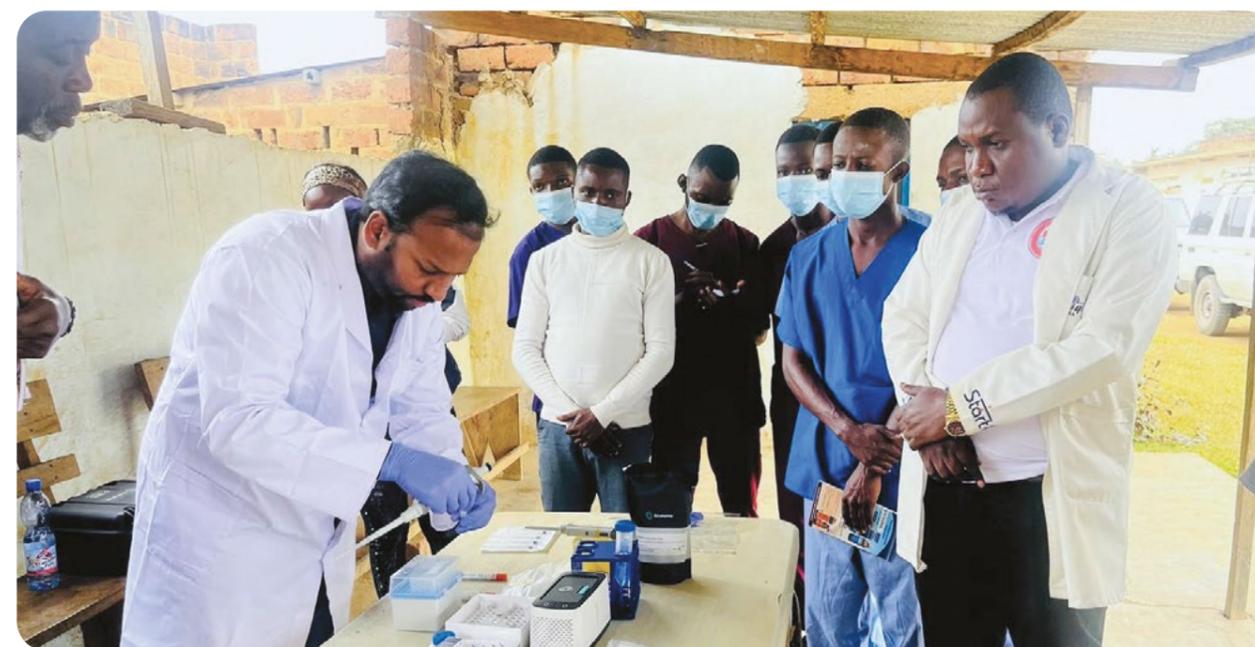
World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva, 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>

Filgueira CPB, Moreira OC, Cantanhêde LM, de Farias HMT, Porrozzi R, Britto C, *et al.* (2020) Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(10): e0008750. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008750>



AVANÇO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO PONTO DE ATENDIMENTO PARA DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS CUTÂNEAS

DR SUNDEEP CHAITANYA VEDITHI,
American Leprosy Missions & University of Cambridge



American Leprosy Missions (ALM) é uma organização internacional comprometida em aliviar o impacto das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), conhecidas por causar incapacidades e complicações crônicas. A missão da ALM abrange não apenas a cura física, mas também a restauração da dignidade e da esperança dos indivíduos afetados. A organização lidera o desenvolvimento e o investimento em projetos, sistemas, tecnologias e ferramentas inovadores com o objetivo de promover mudanças sustentáveis e positivas e acelerar a descoberta e a aplicação de soluções pioneiras para o tratamento, a assistência e a eventual erradicação de DTNs de alta morbidade.

Em 2019, uma parceria fundamental foi estabelecida entre a ALM e a Biomeme Inc. Essa colaboração teve origem quando o diretor de Pesquisa e Inovações da ALM participou da Conferência de Micobacteriologia na Colorado State University, onde foi explorado o potencial da tecnologia da Biomeme para detectar infecções por micobactérias. Consequentemente, a ALM e a Biomeme Inc. firmaram um acordo de biodesenvolvimento e compartilhamento de receita para pesquisar e desenvolver diagnósticos moleculares baseados em qPCR para DTNs, econômicos, fáceis de usar em campo e adequados para uso em hospitais e centros de diagnóstico em países tropicais com prevalência de DTNs. Em 2020, a ALM, em cola-

boração com o Centro Kumasi de Pesquisa Colaborativa em Gana, o Instituto Schieffelin de Pesquisa em Hanseníase na Índia e a Colorado State University nos EUA, desenvolveu ensaios moleculares independentes capazes de detectar a úlcera de Buruli (UB) ou a hanseníase em isolados clínicos.

O sistema qPCR Biomeme Franklin™ representa um avanço significativo no diagnóstico molecular. Esse sistema compatível com o campo, com melhor custo-benefício e rápido opera em temperatura ambiente e é ideal para a detecção em tempo real baseada em qPCR de ácidos nucleicos de patógenos nos locais de atendimento. O sistema operado por bateria apresenta reagentes de extração »



de DNA em um cartucho fechado, permitindo a extração rápida de ácidos nucleicos de amostras de pele sem risco de contaminação cruzada. Os reagentes pré-misturados para qPCR são liofilizados, garantindo um tempo de conservação estável e prolongado em temperatura ambiente (15-45° C). O processo da amostra ao resultado leva aproximadamente uma hora e requer treinamento mínimo, tornando o diagnóstico simples, preciso e viável em instalações de saúde remotas. A implementação desses sistemas de qPCR em unidades de saúde periféricas em países endêmicos para hanseníase é crucial para o diagnóstico confirmatório, dada a diminuição da experiência clínica em hanseníase. Os estudos preliminares de prova de conceito do teste Biomeme para hanseníase, realizados com parceiros na Índia, na Tanzânia e nos EUA, demonstraram uma sensibilidade superior a 95% para a hanseníase paucibacilar e multibacilar e uma especificidade de mais de 99%. Atualmente, nosso objetivo é realizar uma avaliação multicêntrica do desempenho desses testes qPCR para hanseníase da Biomeme para confirmar sua eficácia e testar a viabilidade de implementação no sistema de saúde periférico. Os testes da Biomeme para a úlcera de Buruli superaram o desempenho dos sistemas qPCR padrão em laboratórios de referência para diagnóstico, com avaliações em andamento para os testes de hanseníase.

Os resultados iniciais revelam uma sensibilidade de 98% na detecção de DNA bacteriano padrão a partir de apenas três células bacterianas em amostras de tecido de raspagem de pele para hanseníase e uma sensibilidade de 95% para a úlcera de Buruli (UB), mantendo uma especificidade de 100% para ambos os testes. Esse desempenho é atribuído à seleção de genes específicos de patógenos, conforme detalhado

na literatura publicada. Uma abordagem semelhante foi implementada com sucesso em Gana para o diagnóstico da Covid-19 durante 2020 e 2021, usando os testes qPCR da Biomeme em unidades móveis de diagnóstico, mostrando-se efetiva na expansão da cobertura para detecção e referência. A ALM facilitou o fornecimento de máquinas e reagentes de qPCR para essa iniciativa.

As DTNs cutâneas são a terceira causa mais prevalente de doenças em todo o mundo e estão entre as dez principais causas de incapacidade, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Elas exigem abordagens semelhantes para detecção e manejo, sendo que o diagnóstico molecular é crucial para identificar cinco doenças: hanseníase, UB, boubá, leishmaniose dérmica e micetoma. Com o financiamento da Fundação Anesvad e da Fundação Raoul Follereau, a ALM agora utilizará sua experiência no desenvolvimento de testes diagnósticos para criar um teste multiplex para a detecção simultânea dessas cinco DTNs cutâneas usando o sistema Biomeme.

Laboratórios de pesquisa e centros de referência para diagnóstico selecionados em Benin, Camarões, Costa do Marfim, Gana, Sudão, Espanha e Holanda desenvolverão e avaliarão os ensaios Biomeme Multiplex para DTNs cutâneas. Muitos desses países são endêmicos para as DTNs cutâneas visadas, sendo que vários dos laboratórios fazem parte da “Skin NTD Laboratory Network” (Skin NTD LAB-NET), um consórcio de laboratórios principalmente de países da África Ocidental fundado pela OMS e financiado pela ALM, a Fundação Anesvad e a Fundação Raoul Follereau. Coordenada pelo Centro Pasteur de Camarões como laboratório parceiro, essa rede supervisiona o programa de Avaliação

Externa da Qualidade (EQA) para o diagnóstico da UB e boubá nos laboratórios membros. Ela garante a coleta, a compilação e a disseminação oportunas dos resultados para hospitais, programas nacionais, ministérios da saúde e pacientes, exemplificando o compromisso da ALM com o fortalecimento das capacidades de diagnóstico e com a melhoria dos resultados de saúde em regiões afetadas por DTNs.

Para o desenvolvimento e a avaliação dos testes Biomeme para *Leishmania* usando *primers* e sondas específicos do gênero, colaboramos com a Unidade de Leishmaniose e Doença de Chagas do Centro Nacional de Microbiologia - Instituto de Salud Carlos III (ISC-III), da Espanha. Como Laboratório Nacional de Referência para infecções por *Leishmania*, o ISC-III tem a responsabilidade de apoiar o Sistema Nacional de Saúde da Espanha no controle de infecções por *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. Esse centro é especializado no diagnóstico e na análise da resposta imunológica à leishmaniose canina natural e experimental. Os cientistas têm se dedicado a desenvolver um modelo de infecção experimental em cães, usado com sucesso na avaliação de antígenos de *Leishmania* e em testes laboratoriais de vacinas contra a leishmaniose canina. O ISC-III desenvolverá os testes Biomeme específicos do gênero *Leishmania* e, posteriormente, permitirá que o Noguchi Memorial Institute for Medical Research em Accra, Gana, realize a validação analítica e clínica. Além disso, o ISC-III poderá contribuir para o desenvolvimento de testes qPCR Biomeme Multiplex específicos para cada espécie de *Leishmania*, adequados a diferentes regiões geográficas. Essa tarefa será realizada além dos testes multiplex para DTNs cutâneas mencionados anteriormente. •

FORMALIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PORTADORES DE LEISHMANIOSE - ABRAPLEISH

ALEX LAGO, TANIELE CUSTÓDIO, ELY AMORA, ANA PAULA FERREIRA, ABRAPLEISH



As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos por flebotomíneos, que incluem mais de 20 espécies. É uma doença infecciosa, não contagiosa, que afeta milhares de pessoas em várias regiões do mundo. A doença se divide em duas formas clínicas: leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral, que afetam principalmente pessoas que estão em maior vulnerabilidade socioeconômica.

A Associação Brasileira de Portadores de Leishmaniose (ABRAPLEISH) foi criada com o objetivo de lutar pelas pessoas portadoras de leishmaniose, que muitas vezes vivem em comunidades negligenciadas e com acesso à saúde precário e limitado pelo poder público.

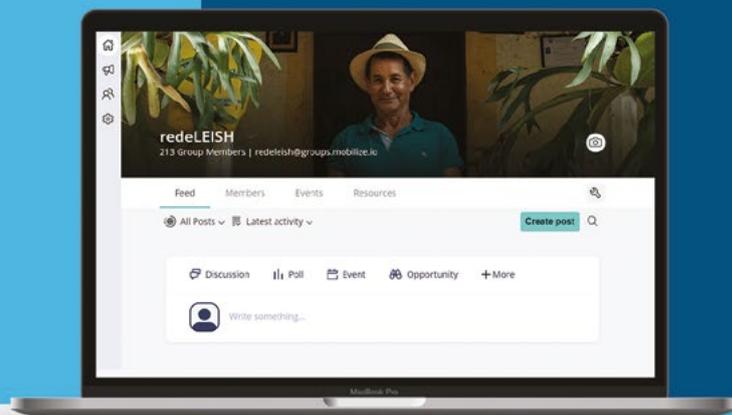
A associação tem o intuito de mobilizar as entidades para que estas ofereçam um melhor acolhimento às pessoas acometidas pela doença. A maioria das unidades de saúde não oferecem excelência no tratamento, diagnóstico e assistência social. Diante de toda essa negligência dos poderes públicos no cuidado às pessoas acometidas pela leishmaniose, o grupo de pesquisa ECLIPSE, do Instituto de Saúde Coletiva (ISC) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), vem atuando em uma região endêmica de leishmaniose da Bahia. Trata-se de uma importante área endêmica, onde são registrados mais de 2 mil casos anuais de leishmaniose tegumentar. Dessa forma, em parceria com a DNDi, surgiu a ideia de convidar as pessoas da comunidade para criar uma associação.

Diogo Galvão, consultor regional de acesso da DNDi, esteve presente na área endêmica para leishmaniose na Bahia e conversou com várias pessoas da comunidade afetadas direta ou indiretamente pela doença. Ele explicou qual seria a importância da criação dessa associação e seu impacto na esfera pública, e assim houve o aceite de algumas pessoas da comunidade. Durante alguns meses, foram realizadas reuniões online para detalhar o processo de refundação da associação, criada em 2018 por Moacir Antonio Zini, que nos deixou em 2020. Algumas pessoas foram convidadas a participar de eventos, como por exemplo o Fórum de Doenças Negligenciadas realizado em Salvador - BA em 2023. No decorrer dos eventos, nós percebemos a importância e a magnitude de uma associação em movimentos sociais. Desde então, estamos aos poucos nos fortalecendo para poder lutar e conseguir melhorias para as pessoas que ainda são negligenciadas pelo poder público.

Sendo assim, nós conseguimos dar início à formalização da associação através do apoio da DNDi, ECLIPSE e de grupos de outras associações de doenças negligenciadas do Brasil. No dia 14 de novembro de 2023, os membros da associação Alex Lago, Taniele Custódio, Ana Paula Ferreira, Ely Amora e outras pessoas da comunidade assinaram a Ata da associação ABRAPLEISH, realizada na cidade Presidente Tancredo Neves/Povoado Corte de Pedra-Bahia, Bairro Próspero Cardoso, Rua 7 de Setembro S/N, CEP 4541600. •



Venha fazer parte do **webfórum** da **redeLEISH!**



Acesse a plataforma online junto com **especialistas de toda a América Latina** para receber e compartilhar **informações sobre pesquisas em leishmanioses**

O fórum funciona como uma rede social na qual você pode receber as atualizações também via e-mail. Os membros podem interagir e publicar novidades, o que facilita a comunicação entre os colaboradores. Dessa forma, incentivamos o compartilhamento de documentos e artigos científicos, a divulgação de eventos, o debate, o esclarecimento de dúvidas e a conexão com novos contatos.

Faça sua inscrição
pelo QR code



ou acesse pelo link
tinyurl.com/3sncc9z9

EXPEDIENTE

Conselho editorial:

Byron Arana, Joelle Rode e Marina Certo

Coordenação:

Joelle Rode

Produção:

Marina Certo

Tradução:

Lítero Traduções

Revisão:

Carolina Alfaro, Joelle Rode,
Karla Menezes e Marina Certo

Fotos:

Appili Therapeutics Inc, American Leprosy
Missions, Vinicius Berger-DNDi, ABRAPLEISH

Diagramação:

Alerta!design



DNDi América Latina

Rua São José, 70, sala 601- CEP 20010-020 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Tel: +55 21 2529-0400 | www.dndi.org

Sede DNDi

15 Chemin Camille-Vidart 1202 - Genebra - Suíça
Tel: +41 22 906 9230 | Fax: +41 22 906 9231 | www.dndi.org