



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

ANA JESSICA SOUSA COELHO

**ANÁLISE DO LÓCUS DE SENSIBILIDADE À MILTEFOSINA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania infantum* ORIUNDOS DE PACIENTES EM
UMA ÁREA DE ALTA ENDEMIAS**

SÃO LUÍS
2025

ANA JESSICA SOUSA COELHO

**ANÁLISE DO LÓCUS DE SENSIBILIDADE À MILTEFOSINA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania infantum* ORIUNDOS DE PACIENTES EM
UMA ÁREA DE ALTA ENDEMICIA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde –
Universidade Federal do Maranhão,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra Mayara Ingrid Sousa
Lima
Coorientadora: Dra Juliana Brambilla
Carnielli Trindade

SÃO LUÍS

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFM

Sousa Coelho, Ana Jessica.

Análise do lócus de sensibilidade à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania infantum* oriundos de pacientes em uma área de alta endemia / Ana Jessica Sousa Coelho. - 2025.

97 f.

Coorientador(a) 1: Juliana Brambilla Carnielli Trindade.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Resistência Às Drogas. 3. Sensibilidade. 4. Lócus Msl. I. Carnielli Trindade, Juliana Brambilla. II. Sousa Lima, Mayara Ingrid. III.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

Aluno: Ana Jessica Sousa Coelho

Título: ANÁLISE DO LÓCUS DE SENSIBILIDADE À MILTEFOSINA EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania infantum* ORIUNDOS DE PACIENTES EM UMA ÁREA DE ALTA ENDEMIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra Mayara Ingrid Sousa Lima

Coorientadora: Dra Juliana Brambilla Carnielli Trindade

Aprovado em 27 de Fevereiro de 2025

Banca Examinadora

Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima – Orientadora
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

1º Examinadora Prof^a. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

2º Examinadora Prof^a. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni
Universidade de São Paulo – USP

3º Examinador Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

“A persistência é o caminho do êxito.” –
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida, pela força que me sustentou e por ser meu refúgio nos momentos de alegria e de dificuldade.

À minha avó, **Juracy**, que foi tanto mãe quanto pai para mim. Sou imensamente grata por cada conselho, incentivo e pelo exemplo de perseverança que me ensinou. Obrigada por suas orações, pelo seu amor incondicional e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos. Te amo profundamente.

Dividindo esse papel de mãe, agradeço de coração à minha mãe de criação, **Iracelia**. Obrigada por acolher, educar e cuidar de uma criança que nem era sua, mas que você amou como se fosse. O que a senhora fez por mim no passado, poucos fariam, ainda mais sendo tão jovem. Se eu tivesse mil vidas, ainda assim não seriam suficientes para retribuir tudo o que a senhora e a vó fizeram por mim. Minha eterna gratidão.

Ao meu noivo, **Pedro Henrique**, meu companheiro dessa louca jornada acadêmica. Agradeço imensamente pelo seu amor, paciência e compreensão ao longo de todo esse processo. Obrigada por segurar minha mão nos momentos de ansiedade e estresse, por ser meu refúgio nos dias difíceis e por sempre acreditar em mim. Também sou grata por compreender minha ausência em diversos momentos, especialmente por morarmos distantes um do outro. Sua compreensão, carinho e dedicação foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Te amo e sou imensamente grata por tê-lo ao meu lado.

Às minhas queridas amigas de Trizidela, **Rithala Mylena** e **Talyta Guimarães**. Não tenho palavras suficientes para agradecer todas as conversas, os conselhos e as risadas que tornaram essa jornada muito mais leve e cheia de sentido. Mesmo que o tempo e a distância nos façam conversar menos do que gostaríamos, sei que nossa amizade é imutável. Passamos meses sem trocar mensagens, mas o vínculo que temos é eterno, e sei que posso contar com vocês em todos os momentos. Agradeço à Rithala por ser aquela voz firme e amiga que nunca me deixa desistir, mesmo quando quero jogar tudo para o alto (ainda bem que ela tem a disciplina de um

general, hahahaha). Talyta, sua presença é sempre um alicerce de carinho e apoio, mesmo que a distância nos separe. Amo demais vocês, e sou imensamente grata por sempre estarem ao meu lado, não importa o que aconteça.

À minha **tia Marlene e toda a família**, minha gratidão é imensa por me acolherem como uma verdadeira filha. Agradeço profundamente por sempre me receberem de braços abertos em sua casa, pelo carinho, compreensão e apoio constantes que me oferecem. Cada gesto de amor e acolhimento fez toda a diferença para mim, e sou eternamente grata por ter pessoas tão especiais ao meu lado.

Aos **meus amigos de São Luís**, especialmente aos meus companheiros do LabGeM, aos que já partiram em busca de novos desafios na pós-graduação e aos que continuam comigo nos preparativos para seguir o mesmo caminho, sou imensamente grata. Obrigada por me proporcionarem momentos especiais no grupo e por fortalecerem minha trajetória como profissional. Cada um de vocês foi essencial para o meu crescimento, ajudando a complementar minhas habilidades e me tornando uma cientista mais completa. Desejo a todos muitos sucessos na vida acadêmica e que continuem lutando pela ciência e pelo SUS. Amo vocês e sou eternamente grata por tudo.

À **Santinha**, que desempenhou um trabalho excepcional e cuidou de cada um de nós no laboratório com tanto carinho. A senhora é muito mais do que uma técnica, é uma verdadeira mãe para todos nós. Sou imensamente grata pelos conselhos, pelo apoio incondicional e pela presença acolhedora em todos os momentos. Você é um exemplo de profissionalismo, dedicação e humanidade, e admiro muito a pessoa que é.

À **Juliana** e ao **Matheus**, minha imensa gratidão por me receberem em sua casa durante um mês. Obrigada pelos rolês por São Paulo, pela companhia incrível e por tornarem minha estadia na cidade a melhor possível. Obrigada também pelas maratonas de *The Big Bang Theory*—mesmo sabendo que vocês ainda não me perdoaram por ter assistido tudo antes de vocês! Hahaha. Um agradecimento especial à Juliana: muito obrigada por interromper seus experimentos naquele mês para me ajudar nos meus, por me acolher no laboratório e por compartilhar comigo

tantos ensinamentos valiosos. Sou extremamente grata pelo seu apoio, carinho e pelas conversas que, sem dúvida, me ajudaram a não enlouquecer no mestrado. Obrigada por acreditar em mim nos momentos em que eu mesma duvidei da minha capacidade e por me lembrar, sempre, que sou mais forte do que penso. Como você mesma diz, “tenho síndrome de vira-lata”, mas você me mostrou que sou capaz. E isso, para mim, não tem preço.

Às minhas amigas **Anna Clara e Thaiza**, meu muito obrigada! Sou imensamente grata pelo apoio de vocês, dentro e fora do laboratório, pelo companheirismo e por estarem sempre por perto, seja para conversarmos bobagens ou para ouvirem minhas angústias e reclamações sobre quase tudo. Ter vocês ao meu lado fez toda a diferença nessa caminhada, e eu não poderia ter pedido amigas melhores. Espero, de coração, que nunca percamos essa amizade tão especial.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, **Rayssa, Renata e Vinícios**, meu sincero obrigada. Sou muito grata por todas as conversas, conselhos e risadas que tornaram essa jornada mais leve. Acima de tudo, vocês foram essenciais para transformar essa caminhada em algo ainda mais especial. Obrigada pelos rolês de bicicleta, pelas aventuras gastronômicas nos finais de semana e por cada momento compartilhado. Aprendi muito com vocês, tanto dentro quanto fora da sala de aula, e levarei essas lembranças comigo para sempre. O futuro é incerto, mas para ele eu desejo duas coisas: que vocês sejam bem-sucedidos em suas carreiras e que nossa amizade continue forte, independentemente do caminho que cada um seguir.

À **Prof.^a Dr.^a Beatriz Stolf**, minha sincera gratidão por me acolher em seu laboratório durante um mês. Obrigada por me receber de braços abertos e pelo acolhimento generoso. Durante minha estadia, aprendi muito, e cada experiência foi valiosa para meu crescimento. A senhora é um grande exemplo de profissionalismo, dedicação e comprometimento com tudo o que faz. Sou imensamente grata pela oportunidade de estágio e por todo o aprendizado que levarei comigo.

À **Dra. Juliana Brambilla Carnielli Trindade**, minha coorientadora, minha mais sincera gratidão. Muito obrigada por todo o apoio, dedicação e por acreditar neste

projeto. Sem a sua orientação e contribuição, este mestrado não teria sido possível. A senhora é uma grande pesquisadora, uma profissional inspiradora, e espero poder continuar essa parceria que se iniciou no mestrado por muitos outros caminhos futuros.

À minha orientadora, **Mayara Ingrid Sousa Lima**, meus mais sinceros agradecimentos. Desde a graduação, a senhora acreditou em mim, enxergando potencial onde, muitas vezes, eu mesma duvidava. No mestrado, essa confiança permaneceu, e sou imensamente grata por todo o apoio, orientação e incentivo ao longo desses anos. Minha gratidão é imensa, e espero levar comigo não apenas o conhecimento adquirido, mas também o exemplo de profissionalismo e paixão pela ciência que a senhora transmite.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa, e à **UFMA**, por me proporcionar a realização do sonho do ensino superior e da pós-graduação, meu mais sincero agradecimento. Agradeço também ao **PPGCS** e a todos os profissionais que fazem parte deste programa, cujo apoio foi fundamental para minha trajetória. Cada detalhe desta pesquisa só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas. Tudo o que sou hoje e cada conquista que alcanço são frutos não apenas do meu esforço, mas também do apoio, dedicação e incentivo de todos que, de alguma forma, contribuíram para essa caminhada.

RESUMO

A quimioterapia constitui a principal estratégia de tratamento da leishmaniose visceral (LV). No entanto, os fármacos de primeira escolha, como o antimonial pentavalente (Glucantime®) e a Anfotericina B (Amb), apresentam alta toxicidade e requerem administração parenteral, o que dificulta a adesão do paciente à terapia. A Miltefosina (MT) surge como uma alternativa promissora, embora sua eficácia varie entre as espécies de *Leishmania*, especialmente *Leishmania (L.) infantum*. Estudos prévios demonstram que a baixa resposta dessa espécie à MT no Brasil está associada à resistência natural ao fármaco, relacionado à deleção do *lôcus* MSL (*Lôcus de Sensibilidade à Miltefosina*) no parasito. Diante disso, este estudo investigou a relação entre a deleção do *lôcus* MSL e a resistência *in vitro* à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com leishmaniose visceral em zona endêmica. A suscetibilidade à MT foi testada em formas promastigotas através do ensaio de MTT e em amastigotas intracelulares utilizando modelo de infecção *in vitro* em macrófagos para contagem da taxa de infecção após tratamento com miltefosina. As sequências foram mapeadas e a cobertura de leitura nas regiões do MSL foi estimada para determinar se os genes estavam deletados. Os resultados demonstraram variabilidade intraespecífica na sensibilidade à MT em ambos os estágios do parasito. A IC50 em formas promastigotas variou de 5,84 a 25,17 µM, enquanto as formas amastigotas intracelulares foram mais sensíveis, com EC50 entre 1,56 e 7,36 µM. Ademais, entre os 10 isolados sequenciados, 4 apresentaram deleção do *lôcus* MSL. A partir disso, a associação entre a presença/ausência do *lôcus* MSL e a sensibilidade à MT mostrou uma diferença estatisticamente significativa na EC50 entre os parasitos com e sem a deleção ($p < 0,0001$), indicando que os parasitos MSL- são os mais tolerantes à Miltefosina. Esses achados reforçam que a deleção do *lôcus* MSL no genoma de *Leishmania (L.) infantum* está inferindo na resposta *in vitro* ao tratamento com miltefosina. Assim, a presença ou ausência desse *lôcus* deve ser considerada durante a escolha do tratamento em áreas endêmicas, a fim de evitar sucessivos casos de falha terapêutica.

Palavras-Chave: leishmaniose visceral, resistência às drogas, sensibilidade, *lôcus* MSL

ABSTRACT

Chemotherapy constitutes the primary treatment strategy for visceral leishmaniasis (VL). However, first-line drugs, such as pentavalent antimonial (Glucantime®) and Amphotericin B (Amb), present high toxicity and require parenteral administration, which hinders patient therapy adherence. Miltefosine (MT) emerges as a promising alternative, although its efficacy varies among *Leishmania* species, especially *Leishmania (L.) infantum*. Previous studies demonstrate that the low response of this species to MT in Brazil is associated with natural drug resistance, related to the deletion of the MSL locus (Miltefosine Sensitivity Locus) in the parasite. Therefore, this study investigated the relationship between MSL locus deletion and in vitro miltefosine resistance in clinical isolates of *Leishmania (L.) infantum* from visceral leishmaniasis patients in an endemic area. Miltefosine susceptibility was tested in promastigote forms through the MTT assay and in intracellular amastigotes using an in vitro infection model in macrophages to count the infection rate after miltefosine treatment. Sequences were mapped, and read coverage in the MSL regions was estimated to determine gene deletions. Results demonstrated intraspecific variability in MT sensitivity in both parasite stages. IC₅₀ in promastigote forms ranged from 5.84 to 25.17 μ M, while intracellular amastigote forms were more sensitive, with EC₅₀ between 1.56 and 7.36 μ M. Moreover, among the 10 sequenced isolates, 4 presented MSL locus deletion. The association between MSL locus presence/absence and MT sensitivity showed a statistically significant difference in EC₅₀ between parasites with and without deletion ($p < 0.0001$), indicating that MSL- parasites are more tolerant to Miltefosine. These findings reinforce that MSL locus deletion in *Leishmania (L.) infantum* genome is inferring in vitro response to miltefosine treatment. Thus, the presence or absence of this locus should be considered during treatment selection in endemic areas to avoid successive therapeutic failure cases.

Keywords: visceral leishmaniasis, drug resistance, sensitivity, MSL locus.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LV ou VL	Leishmaniose Visceral
AmB	Anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B Lipossomal
ANOVA	Análise de Variância
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IC50/EC50	Concentração Efetiva que inibe a concentração celular em 50%
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
MT	Miltefosina
MSL	Locus de Sensibilidade da Miltefosina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PENT	Pentamidina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HU/UFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
GLU	Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)

SINAM	Sistema de informações de agravos de notificações
WHO	Organização Mundial da Saúde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SIDER2	Retroposons encontrados no genoma de protozoários
GWAS	Genome-wide association Study
CRISPR-CAS9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
PBS	Tampão fosfato salino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SRA	Sequence Read Archive
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BWA-MEM	Burrows-Wheeler Aligner

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Ilustração adaptada de Esch & Petersen (2013).....20

Figura 2. : Distribuição de leishmaniose visceral no mundo. Fonte: adaptado de Ruiz-Postigo et al., 2023.....23

Figura 3. Processo de ligação e captação da miltefosina. (a) Ligação da miltefosina na superfície extracelular da membrana plasmática; (b) A fração da droga que se liga à membrana é transportada para o interior da célula através da ação das flipases na bicamada lipídica e pelo mecanismo de "flip-flop". Esse processo de translocação envolve, pelo menos, duas proteínas da membrana plasmática: o transportador de miltefosina LdMT e sua subunidade beta, LdRos3. Fonte: Perez-Victória et al 2006.....27

CAPÍTULO I:

Figura 1. Distribuição geográfica da origem dos isolados clínicos no estado do Maranhão. Mapa gerado no software QGis 3.10.10.....52

Figura 2. Curva de crescimento e taxa de infecção de cinco isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*. (A) Curva de crescimento. Os dados representam a média de três curvas de crescimento obtidas em experimentos independentes. (B) Percentual de infecção de macrófagos RAW 264.7 por isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*.....53

Figura 3. Análise da presença e ausência do *locus* MSL por bioinformática. (A) Número de cópias dos quatro genes nos isolados, incluindo os 10 isolados selecionados para este estudo, calculado pela divisão da profundidade média (MeanDepth) pela cobertura média do genoma (GenomeCoverage) (B) Média entre os valores de cobertura normalizada dos genes MSL: gene: ≈ 2 = 4 cópias; ≈ 1 = 2 cópias; $\approx 0,5$ = heterozigoto; 0= nenhuma cópia/deleção.....54

Figura 4. (A) Susceptibilidade à miltefosina em cepas de *Leishmania (L.) infantum* com presença (MSL+) ou ausência (MSL-) do *locus* MSL. Os valores de IC50/EC50 foram determinados para promastigotas e amastigotas, sendo analisada a associação entre esses valores e o perfil genotípico do *locus* MSL. A linha central nos gráficos indica a mediana dos valores observados para cada grupo (B) e (C) Gráfico de correlação entre número de cópias do *locus* MSL e a sensibilidade *in vitro* à Miltefosina. Meandepth norm e IC50 Promastigota ($\rho = -0,760^*$ $p = 0.011$) Meandepth norm e EC50 Amastigota ($\rho = -0,821^{**}$ $p = 0.004$).....58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Gênero <i>Leishmania</i>	19
2.1.1 Leishmaniose	20
2.1.2 Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiologia.....	22
2.2 Quimioterapia.....	24
2.2.1 Miltefosina	25
2.3 Mecanismos de ação da miltefosina	26
2.4 Sensibilidade e resistência à miltefosina em <i>Leishmania spp.</i>	28
2.5 Genômica de <i>Leishmania</i>	30
2.6 Locus MSL.....	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO I - Artigo a ser submetido na Revista: Acta Tropica. Qualis A2.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3. RESULTADOS.....	51
4. DISCUSSÃO.....	58
5. CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma infecção sistêmica causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum* (sinônimo de *Leishmania (L.) chagasi*) (BANETH et al., 2008). Essa doença tem caráter progressista e acomete principalmente o sistema reticulo-endotelial e os órgãos linfoides, como baço, fígado e medula óssea. Os sintomas variam desde manifestações clínicas mais brandas como febre e anemia à hepatoesplenomegalia (MCGUIRE; SATOSKAR, 2014). Além disso, a LV pode causar imunossupressão tornando o hospedeiro suscetível a infecções secundárias - como pelo vírus HIV, assim, se não tratada de forma adequada a doença pode levar ao óbito (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000).

O estado do Maranhão registra os maiores índices de novos casos de leishmaniose visceral na região Nordeste, nos últimos cinco anos foram notificados aproximadamente 1.816 novos casos, consolidando-se como uma área crítica para o controle da doença (OMS, 2023). A quimioterapia é o principal método de tratamento, no entanto, os fármacos de primeira linha, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e a anfotericina B, apresentam limitações significativas, incluindo efeitos colaterais graves e alto custo, dificultando a adesão dos pacientes ao tratamento (BRASIL, 2015; MOORE et al., 2010). Além disso, tem-se observado um aumento nas taxas de falhas terapêuticas e recidivas, ressaltando a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes (CROFT et al., 2006).

Neste contexto, a miltefosina surge como uma opção promissora, devido à sua alta taxa de eficácia (superior ao Glucantime® e a Anfotericina B) e à administração por via oral. Inicialmente desenvolvida para tratar o câncer de mama (DORLO et al., 2012), a miltefosina destaca-se como o primeiro medicamento oral aprovado para o tratamento da leishmaniose visceral, inicialmente no subcontinente indiano. Apresentando altas taxas de cura em pacientes infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (SUNDAR et al., 2002), a miltefosina oferece vantagens como a administração oral e uma distribuição eficaz no sistema mononuclear fagocítico, alvo principal dos parasitos causadores da leishmaniose (BARIONE, 2014; SUNYOTO et al., 2018).

Apesar dessas vantagens, a miltefosina possui limitações: ela é potencialmente teratogênica e possui uma meia-vida longa, o que pode favorecer o surgimento de

parasitos resistentes, pois a droga pode permanecer em concentrações subterapêuticas no organismo semanas após o tratamento (BERMAN, 2005; DORLO et al., 2012). Além disso, falhas terapêuticas e recidivas vêm sendo observadas em diversas regiões (SUNDAR et al., 2001; CROFT et al., 2006), com a variação de sensibilidade dos parasitos ao fármaco sendo um dos fatores associados a esses eventos (DA LUZ et al., 2009).

No Brasil, um estudo clínico de fase II revelou baixa eficácia da miltefosina em pacientes com leishmaniose visceral, com taxas de cura de apenas 42% para o tratamento recomendado de 28 dias e 68% para o tratamento prolongado de 42 dias. Fatores diversos podem estar associados a essa baixa eficácia, sendo uma das hipóteses a existência de uma resistência natural do parasito nas populações circulantes do Brasil (CARNIELLI et al., 2019). Para testar essa hipótese trabalhos posteriores utilizando a abordagem de estudo de associação genômica ampla (GWAS, sigla do inglês Genome-wide association study) investigaram possíveis variações genômicas do parasito associadas com a falha no tratamento dos pacientes brasileiros (CARNIELLI et al., 2018). Os resultados desse estudo apontaram o *lôcus* MSL (*Lôcus* de Sensibilidade à Miltefosina, sigla do inglês *Miltefosine Sensitive Locus*) como significativamente associado à falha do tratamento com miltefosina (CARNIELLI et al., 2018).

O *lôcus* MSL, localizado no cromossomo 31 do parasito de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, é considerado geneticamente estável e contém quatro genes, sendo eles: LINF_310031200 e LINF_310031300, codificando 3'-nucleotidase/nuclease (NUC1 e NUC2, respectivamente); LINF_310031400, codificando uma proteína semelhante a helicase (HLP); e LINF_310031500, codificando 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (TEI). Esses genes estão envolvidos na captação, síntese e metabolismo de lipídios, essenciais para a membrana celular dos parasitos (CARNIELLI et al., 2018).

Diante deste cenário, diferentes grupos de pesquisa têm conduzido ensaios clínicos para validar o uso da miltefosina no tratamento de leishmaniose visceral no Brasil (ESPADA et al., 2021; FERREIRA et al., 2023). Alguns estudos já indicam baixa eficácia da droga e uma forte associação entre falhas terapêuticas e recidivas e a deleção do *lôcus* MSL. Considerando o alto índice de endemicidade da doença no Maranhão, destaca-se a importância de incluir os parasitos circulantes no estado

nessas abordagens, com o objetivo de validar ou refutar o uso da miltefosina como opção terapêutica para a leishmaniose visceral.

Nosso grupo de pesquisa, o Grupo de Estudos em Biotecnologia e Genética (BioGen), mantém um banco de isolados identificados como *Leishmania infantum*, que estão criopreservados e acessíveis no biorrepositório do LabGeM/UFMA. A partir desse banco de dados, nossos resultados preliminares indicam variações na suscetibilidade desses isolados à miltefosina, o que motivou a realização de um estudo aprofundado sobre a relação entre a deleção do *lôcus* MSL e a sensibilidade à miltefosina em ensaios *in vitro*.

Em continuidade aos estudos anteriormente realizados pelo Grupo de Estudos em Biotecnologia e Genética – BioGen, propomos a realização desta dissertação, apresentado no Capítulo 1 em formato de artigo a ser submetido na revista *Acta tropica*. Neste trabalho, conduzimos uma análise com isolados clínicos provenientes de pacientes maranhenses. Analisando 10 isolados clínicos do Maranhão, nosso objetivo investigar a relação entre a deleção do *lôcus* MSL e a resistência *in vitro* à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com leishmaniose visceral em zona endêmica.

Este estudo propõe que a deleção do *lôcus* MSL no genoma do parasito de *Leishmania (L.) infantum* está associada à resistência à miltefosina, o que pode explicar a baixa eficácia do fármaco em isolados clínicos brasileiros. A recente descoberta dessa deleção pode esclarecer aspectos fundamentais da resposta ao tratamento com miltefosina. Assim, este estudo possui relevância clínica, pois permitirá determinar a frequência de isolados *Leishmania (L.) infantum* MSL+ e MSL- circulantes no estado do Maranhão, auxiliando no prognóstico terapêutico e na tomada de decisão sobre a liberação da miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Leishmania*

A leishmaniose é uma antroponose causada por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (REY, 2016; ARAÚJO et al., 2020; MAXFIELD et al., 2023). As *Leishmania spp.* apresenta duas formas morfológicamente distintas: as formas promastigotas e as amastigotas (LIMA et al., 2021; MAXFIELD et al., 2023). As amastigotas, são encontradas no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados infectados; e as promastigotas, formas flageladas, encontradas no trato digestório do inseto vetor (REY, 2016; MAXFIELD et al., 2023). O gênero *Leishmania* é dividido em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*. Existem espécies patogênicas ao homem em todos os subgêneros, exceto em *Sauroleishmania* (ESPINOSA et al., 2018; JARIYAPAN et al., 2018; INTAKHAN et al., 2022).

Como um parasito de ciclo heteroxênico, o desenvolvimento ocorre em dois hospedeiros distintos: um inseto vetor e um vertebrado (REY, 2016). A infecção no vetor ocorre durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Durante esse processo a fêmea de flebotomíneo ingere células infectadas com amastigotas do parasito (NEUBER, 2008; SACKS; PERKINS, 1984). No intestino do inseto, essas células se rompem e liberam as amastigotas que, rapidamente, se diferenciam em promastigotas flageladas. Estas se aderem ao epitélio do intestino médio ou posterior (dependendo da espécie do parasito) e iniciam uma intensa atividade replicativa por divisão binária (SACKS; PERKINS, 1984; RITTIG; BOGDAN, 2000; BESTEIRO et al., 2007; CHAPPUIS et al., 2007).

Após a divisão, os parasitos migram para a válvula estomodeal, onde se concentram e sofrem um processo de diferenciação denominado metaciclogênese (SACKS, 1989). Durante a metaciclogênese, os parasitos sofrem redução do tamanho do corpo celular e tornam-se extremamente móveis e infectivas. As promastigotas metacíclicas migram para a probócite e podem ser transmitidas para um novo hospedeiro em um próximo repasto sanguíneo (BESTEIRO et al., 2007; ARRUDA, 2010).

Eventualmente, as formas metacíclicas são fagocitadas por neutrófilos, monócitos, células dendríticas e/ou macrófagos residentes da derme (MCNEELY;

TURCO, 1990). Após a fagocitose, estes se diferenciam em amastigotas, que permanecem no interior de organelas denominadas fagolisossomos (MCNEELY; TURCO, 1990; SPATH et al., 2000; CUNNINGHAM, 2002). Uma vez liberadas, as amastigotas podem se disseminar pelos sistemas linfático e vascular, sendo fagocitadas por novas células ou ainda ser ingeridas por outro flebotomíneo durante um novo repasto, reiniciando o ciclo de vida do parasito (BATES, 1994; PETERS et al., 2008). A Figura 1 ilustra o esquema com o ciclo biológico da *Leishmania*.

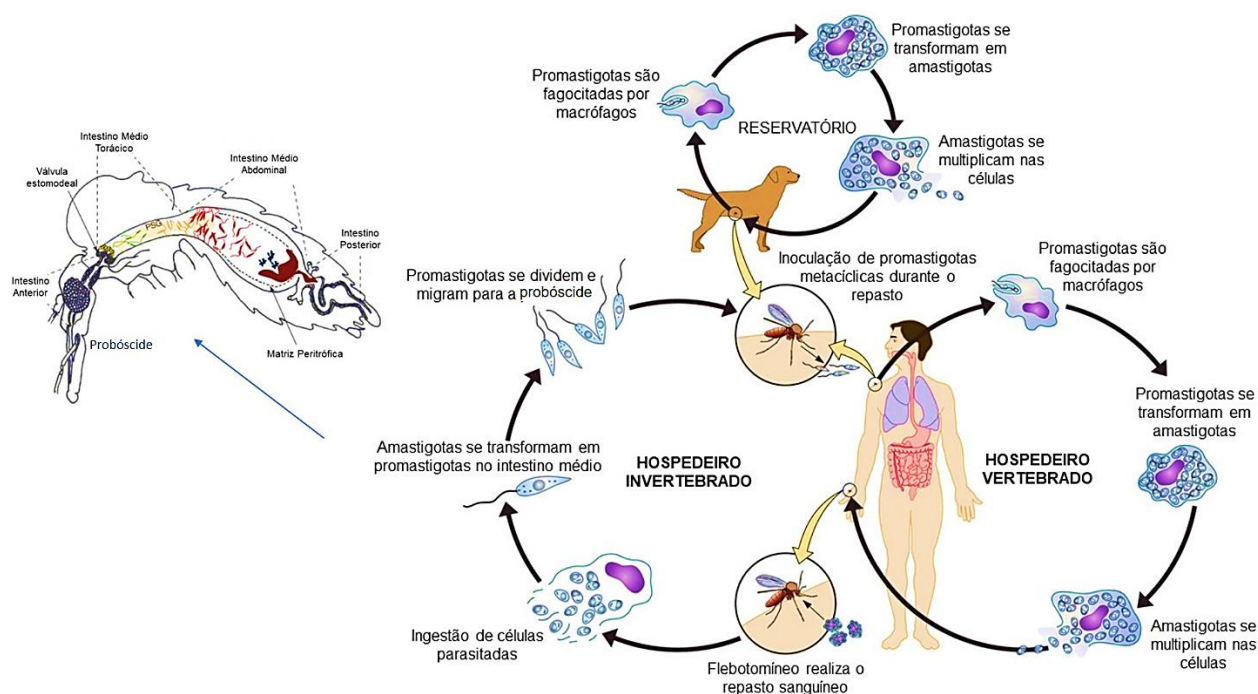


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Ilustração adaptada de Esch & Petersen (2013).

2.1.1 Leishmaniose

O curso de infecção é definido por uma série de determinantes, tanto fatores intrínsecos ao parasito (ex.: espécie, cepa e virulência) quanto fatores ligados ao hospedeiro vertebrado (ex.: genética e resposta imune). A interação entre esses fatores ocasiona um amplo pleomorfismo clínico, que varia desde manifestações com lesões dérmicas a uma infecção sistêmica que progressivamente afeta os órgãos linfoides (MURRAY et al., 2005; BURZA et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), existem duas principais formas clínicas da doença: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2023).

A leishmaniose tegumentar é a forma clínica mais comum da doença e é caracterizada por lesões dérmicas, que podem ser únicas ou múltiplas localizadas, múltiplas disseminadas ou mucosas (CHRISTENSEN et al., 2019). As lesões podem se desenvolverem no local da picada do vetor e surgir após um período médio de 30 dias. As regiões anatômicas mais afetadas são aquelas expostas à picada do vetor, como face e os membros superiores e inferiores (CHRISTENSEN et al., 2019). A LT pode ser expressa nas seguintes síndromes clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) (TORRES- GUERRERO et al., 2017; BURZA et al., 2018). No Brasil, a LT pode ser ocasionada por diversas espécies do parasito, como: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) lindenbergi*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) apresenta lesão do tipo úlcera, podendo ser única ou múltipla. Essas lesões possuem a tendência de regredir espontaneamente, apresentando boa resposta ao tratamento quimioterápico (COSTA et al., 2009; ANVERSA et al., 2018). Todas as espécies de *Leishmania* supracitadas são capazes de ocasionar a LCL, no entanto, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* são as espécies mais comuns no Brasil (COSTA et al., 2009; ANVERSA et al., 2018). A leishmaniose cutânea disseminada (LD) difere da LCL, devido apresentar lesões múltiplas de topologia papular com aparência acneiforme. Essas lesões podem variar quanto ao tipo, aspecto e número (CARVALHO et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2019). No Brasil, existem três espécies do parasito que potencialmente causam LD: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e mais raramente a *Leishmania (L.) amazonensis* (CARVALHO et al., 1994; MEMBRIVE, 2017).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD), por sua vez, é uma síndrome rara (COSTA et al., 2009; CHRISTENSEN et al., 2019) caracterizada por apresentar cronicidade progressiva, riqueza parasitária e um grande comprometimento dérmico com lesões de aspecto eritematoso e nodular (GOTO & LINDOSO, 2010). No Brasil, apenas *Leishmania (L.) amazonensis* causa esta síndrome clínica.

A leishmaniose mucocutânea ou mucosa (LMC) indica o envolvimento de tecidos mucosos com ou sem acometimento de lesão cutânea prévia (AMATO et al., 2007). A mesma apresenta inflamação nasal típica, seguida de ulceração da mucosa

e perfuração do septo nasal (CHAPPUIS et al., 2007; AMATO et al., 2008; JARA et al., 2013). No Brasil, *Leishmania (V.) braziliensis* é a principal espécie envolvida na LMC.

2.1.2 Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiologia

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo de *Leishmania (Leishmania) chagasi*) nas Américas e por *Leishmania donovani* na Europa, África e Ásia (SUNDAR et al., 2006; AKHOUNDI et al., 2016; COSTA et al., 2023). Os flebotomíneos, insetos popularmente chamados de mosquitos, atuam como vetores, sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* a principal responsável pela transmissão de *L. infantum*.

A LV é caracterizada pela disseminação do parasito pelo sistema reticuloendotelial do hospedeiro, o que leva ao comprometimento de órgãos linfoides (ARAÚJO et al., 2020). Esta é a forma mais grave de leishmaniose, manifestando-se como uma doença crônica e debilitante, que, se não tratada adequadamente, pode levar ao óbito em até 90% dos casos (ALVAR et al., 2012). Os principais órgãos afetados incluem o baço, fígado e medula óssea (DE SOUZA et al., 2012; COSTA et al., 2023). Os sintomas mais frequentes são anemia, febre, hepatoesplenomegalia, caquexia e hipergamaglobulinemia (MCGWIRE et al., 2014; COSTA et al., 2023). A infecção ainda pode resultar em imunossupressão, aumentando a suscetibilidade do hospedeiro a infecções secundárias (OSMAN et al., 2000; COSTA et al., 2023).

O cenário epidemiológico da LV é alarmante, sendo amplamente reconhecido como um problema crítico de saúde pública (LOZANO et al., 2012; PIGOTT et al., 2014). A doença é endêmica em aproximadamente 80 países, onde populações estão expostas ao risco de infecção pelo protozoário. Na região das Américas, todos os países notificaram casos à Organização Mundial da Saúde (OMS) (RUIZ-POSTIGO et al., 2023). Mundialmente, a carga da LV é concentrada principalmente em quatro países – Índia, Sudão, Brasil e Quênia – que respondem por cerca de 68% dos casos, com mais de 1000 novas notificações ocorrendo em 2022 (OMS, 2023) (Figura 2).

Em 2022, o Brasil notificou aproximadamente 1.766 novos casos de Leishmaniose visceral (OMS, 2023). A região Nordeste é responsável por 49,9% dos casos registrados no país (BRASIL, 2019). Dentro dessa região, o estado do Maranhão apresenta os maiores índices de notificação de novos casos. Entre 2019 e

2024, os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) indicam o registro de 1.816 casos da doença no estado (SINAN, 2023).

Este cenário destaca tanto a persistência da LV em áreas endêmicas quanto os desafios enfrentados para controlar sua transmissão. O controle da LV apresenta complexidades adicionais, incluindo a presença de vetores adaptados a áreas urbanas e rurais e a diversidade de reservatórios animais. Nos centros urbanos, os cães domésticos representam os principais reservatórios do parasito, enquanto em ambientes silvestres, raposas e marsupiais também servem como fontes de infecção (ARENAS et al., 2017). A presença de cães domésticos infectados agrava o risco de transmissão para humanos, dificultando a interrupção da cadeia epidemiológica. Medidas de controle, como diagnóstico precoce, tratamento adequado e manejo de reservatórios, são essenciais, mas enfrentam barreiras operacionais e de recursos, especialmente em regiões com infraestrutura de saúde limitada. Assim, esforços contínuos e uma abordagem integrada são necessários para reduzir a morbidade e mortalidade associadas à LV.

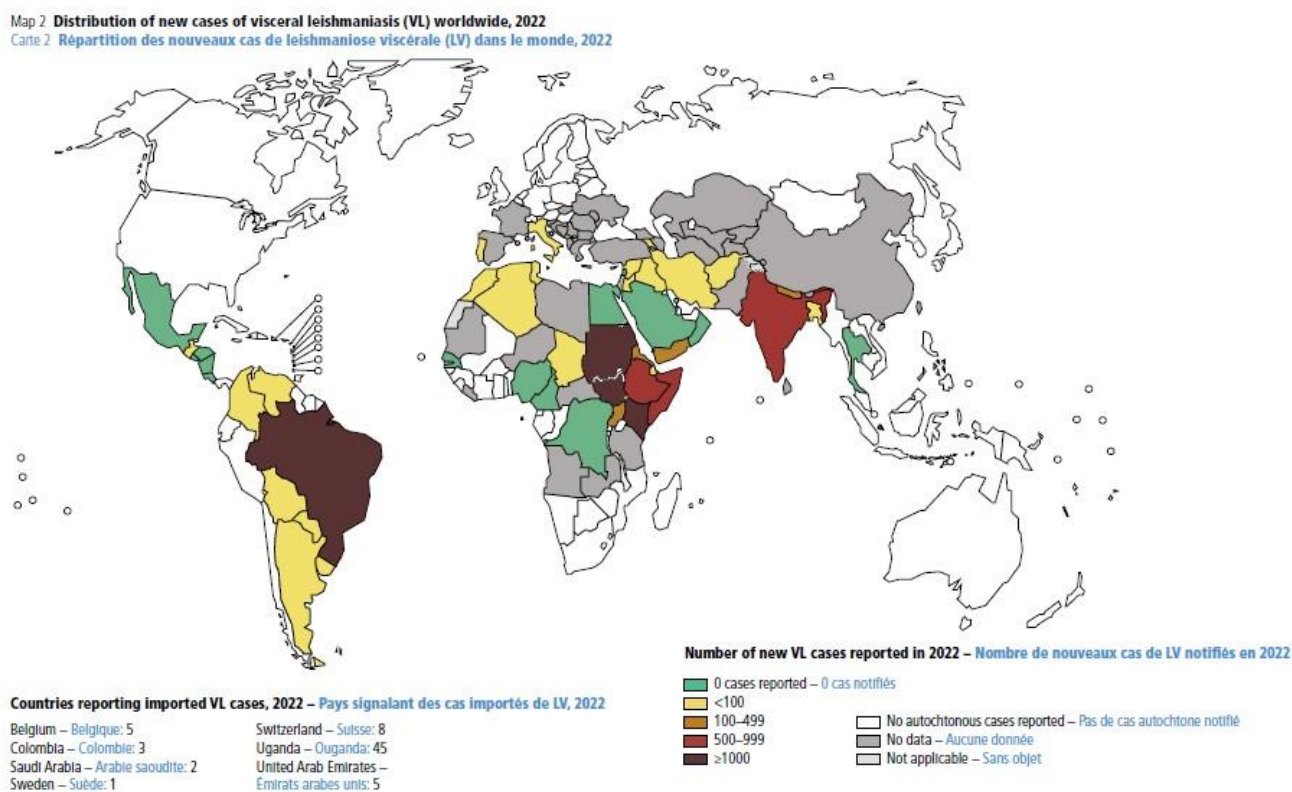


Figura 2: Distribuição de leishmaniose visceral no mundo. Fonte: adaptado de Ruiz-Postigo et al., 2023.

2.2 Quimioterapia

Atualmente, as opções terapêuticas para o tratamento das leishmanioses são restritas. Existem duas classes de medicamentos disponíveis: os antimoniais, como o (estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®)), e os não-antimoniais, que incluem a Pentamidina, Anfotericina B, Paromomicina e Miltefosina (Bansal et al., 2019; Frézard et al., 2001). O tratamento das leishmanioses pode envolver a administração desses fármacos de forma isolada ou combinada, conforme a avaliação clínica e as orientações da equipe médica.

No Brasil, a droga de primeira escolha adotada há décadas no tratamento das leishmaniose visceral (LV) é o antimoniato de meglumina (Glucantime®), um antimonial pentavalente (BRASIL, 2017) (Ministério da Saúde, 2022). Contudo, casos que não respondem ao tratamento com antimoniais ou apresentam contraindicações (como gestantes e pacientes HIV-positivos) são tratados com Anfotericina B (BANSAL et al., 2019; FRÉZARD et al., 2001; PONTE-SUCRE et al., 2017). No entanto, a Anfotericina B (AmB) é bastante eficaz, mas apresenta certa toxicidade quando administrada em sua forma livre de desoxicolato. A versão lipossomal reduz o risco de toxicidade em pacientes com leishmaniose visceral (LV), porém, seu elevado custo e a baixa estabilidade em altas temperaturas limitam suas indicações (Ponte-Sucre et al., 2017).

Essas duas drogas apresentam elevada toxicidade, efeitos colaterais graves e são administradas por via parenteral, dificultando a adesão dos pacientes ao tratamento (CROFT et al., 2003). Além de todas essas desvantagens, o surgimento de falhas terapêuticas tem sido um fenômeno recorrente, sendo relatados casos clínicos em todo o mundo (SUNDAR et al., 2000; ROMERO et al., 2001; SUNDAR et al., 2001; CROFT et al., 2006).

Esse cenário constitui um grande desafio aos profissionais de saúde que, frequentemente, relatam diferenças na manifestação e na gravidade da doença, bem como na resposta dos pacientes aos tratamentos preconizados (T'KINDT et al., 2010). Sendo assim, diversos esforços têm sido aplicados à descoberta de novas drogas ou na reposição de compostos com potencial leishmanicida.

2.2.1 Miltefosina

A Miltefosina (MT) ou hexadecilfosfocolina é uma alquifosfocolina (DORLO et al., 2012). Até o momento, a MT é considerada como a primeira e única droga de administração oral utilizada no tratamento das leishmanioses. Inicialmente, este fármaco foi desenvolvido como um agente antitumoral para casos de câncer de mama (BRACHWITZ & VOLLGRAF, 1995). Contudo, a atividade leishmanicida da MT foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* (CROFT et al., 1987; KUHLENCORD et al., 1992).

A atividade *in vitro* foi demonstrada contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) donovani* (CROFT et al., 1987). Posteriormente, a eficácia *in vivo* foi demonstrada em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (CROFT et al. 1987). Neste estudo, os autores demonstraram a atividade leishmanicida da MT em doses diárias de 20 mg/kg/dia. Os resultados foram promissores e demonstraram cerca de 95% de supressão da carga parasitária em órgãos linfoides (CROFT et al. 1987). Este estudo foi importante para o desenvolvimento do programa da MT voltado para o tratamento de LV (CROFT; ENGEL, 2006).

Em 1997, Murray e colaboradores conduziram o primeiro ensaio clínico de fase I/II da MT. O estudo estabeleceu que doses diárias de 100 a 150 mg da droga, administradas durante 28 dias a pacientes indianos com leishmaniose visceral, eram bem toleradas e resultavam em uma elevada taxa de cura (SUNDAR et al., 1998). Posteriormente, estudos de fase II confirmaram a eficácia da droga em casos refratários ao tratamento com antimoniais (JHA et al., 1999; SUNDAR et al., 1999).

Estudos clínicos de fase III, realizados pela OMS em parceria com a companhia farmacêutica ASTA Medica, confirmaram a eficácia da MT no tratamento da leishmaniose, com uma taxa de cura de 94% entre os participantes. A pesquisa foi conduzida em três centros médicos em Bihar, na Índia (ENGEL, 2002; GANGULY, 2002; SUNDAR et al., 2002a). Em 2002, a MT foi aprovada como a primeira droga de administração oral para o tratamento da LV no subcontinente Indiano (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006). Em 2004, o seu uso foi recomendado em casos de LT na Colômbia (SOTO et al., 2004). A partir de 2010, a MT foi incluída na lista de

medicamentos essenciais da OMS para o tratamento das leishmanioses. Hoje, possui aprovação em diversos países, como: Bangladesh, Bolívia, Argentina, EUA, Paraguai, Peru e México (SUNYOTO et al., 2018).

A MT tem demonstrado excelentes taxas de cura em indivíduos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* (SUNDAR et al., 2002; SUNDAR et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2017). Na Índia, foi observado taxa de cura de 94% em pacientes infectados com *Leishmania donovani* (SUNDAR et al., 2002). Na Colômbia, foram observadas taxas de cura de 70 e 92% em pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, respectivamente (JHA et al., 1999; RUBIANO et al., 2012; SUNDAR et al., 2002; SUNDAR et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2017). Na Bolívia, pacientes com LCL causada por *L. (V.) braziliensis* apresentaram taxas de cura de 88% (SOTO et al., 2008).

No Brasil, testes clínicos com pacientes de leishmaniose tegumentar (LT) causada por *Leishmania (V.) braziliensis* mostraram que a miltefosina (MT) foi mais eficaz que o medicamento de referência, o Glucantime®. O grupo tratado com antimônio pentavalente apresentou uma taxa de cura de 53,3%, enquanto o grupo tratado com MT alcançou 75% de cura (MACHADO et al., 2010). Em 30 de outubro de 2018, a Portaria nº 56 tornou pública a decisão de incorporar a MT como primeira linha de tratamento para LT no Brasil. O esquema terapêutico recomendado é de 2,5 mg/kg/dia, por via oral, dividido em 2 a 3 doses diárias, com um máximo de 150 mg por dia. As doses devem ser administradas preferencialmente após as refeições para minimizar os efeitos gastrointestinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). No entanto, um estudo de fase II indicou que a eficácia da MT é reduzida em casos de leishmaniose visceral (LV) causada por *L. (L.) infantum*, com uma taxa de cura em torno de 60% (CARNIELLI et al., 2019).

2.3 Mecanismos de ação da miltefosina

Os mecanismos de ação da miltefosina (MT) ainda não foram completamente elucidados. No entanto, sabe-se que o fármaco apresenta propriedades anfipáticas (DORLO et al., 2012). Após a ingestão, é rapidamente distribuído pelo organismo, com alta biodisponibilidade em órgãos como fígado e baço (MORE et al., 2003). Seu metabolismo ocorre lentamente por meio da ação de fosfolipases, enquanto sua excreção urinária é mínima (DORLO et al., 2012). Apesar de possuir baixa toxicidade,

a MT pode provocar efeitos colaterais gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006). Além disso, devido ao seu potencial teratogênico e à elevação dos níveis de transaminases, ureia e creatinina no sangue, seu uso clínico é cuidadosamente monitorado (FISCHER et al., 2001; KAMINSKY, 2002).

A membrana celular é considerada o sítio primário de ação do fármaco (ALONSO et al., 2012; RAKOTOMANGA et al., 2005; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006). Sabe-se que ao entrar na corrente sanguínea, a MT fica sob a forma micelar (ALONSO et al., 2012) ou se ligar à albumina plasmática, que atua como um reservatório, estabelecendo um equilíbrio entre as moléculas ligadas à proteína e aquelas associadas à membrana plasmática (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006b) (Figura 3A).

Em *Leishmania*, a MT pode ser internalizada por dois mecanismos distintos: (a) através da via endocítica, no qual monômeros de miltefosina integrados na membrana plasmática são internalizados como membros de vesículas, sendo essa atividade restrita à região da bolsa flagelar (MC CONVILLE et al., 2002); e (b) translocação ativa mediada por proteínas flipases específicas, que permitem a passagem de monômeros de miltefosina ou de outros análogos de fosfolipídios de cadeia curta do folheto externo para o interno da membrana plasmática (Figura 3B). Nesse processo, destacam-se o transportador de miltefosina (LdMT) e sua subunidade beta LdRos3, que desempenham papéis fundamentais na captação do fármaco pela célula (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003a; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a).

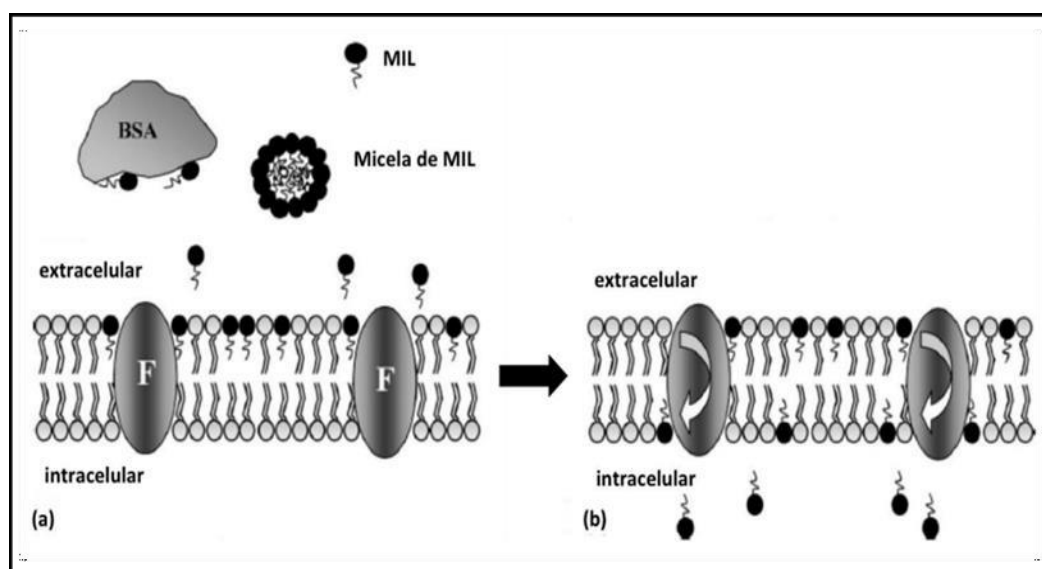


Figura 3 - Processo de ligação e captação da miltefosina. (a) Ligação da miltefosina na superfície extracelular da membrana plasmática; (b) A fração da droga que se liga à membrana é transportada para o interior da célula através da ação das flipases na bicamada lipídica e pelo mecanismo de "flip-flop". Esse processo de translocação envolve, pelo menos, duas proteínas da membrana plasmática: o transportador de Miltefosina LdMT e sua subunidade beta, LdRos3. Fonte: Perez-Victória et al 2006.

Intracelularmente, a MT impede a entrada de colesterol no retículo endoplasmático, levando à depleção deste lipídio e, conseqüentemente, à desregulação de sua biossíntese (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010; MALTA de SÁ et al., 2015). Desta forma, a inibição da síntese de fosfatidilcolina e o estresse no retículo endoplasmático têm sido associados às principais causas de morte celular por mecanismos indireto semelhantes a apoptose induzidas pela droga no parasito (PARIS et al. 2004).

Além de atuar diretamente na morte do parasito, estudos indicam um importante papel da miltefosina como um imunomodulador (DORLO et al., 2012; PALIC et al., 2019). Acredita-se que a MT possa induzir uma polarização de resposta celular de perfil Th1, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-12 e IFN- γ). Ao elevar os níveis dessas citocinas, a MT induz indiretamente um perfil de macrófagos pró- inflamatórios, capazes de eliminar os parasitos (PALIC et al., 2019).

2.4 Sensibilidade e resistência à miltefosina em *Leishmania* spp.

A resistência medicamentosa é caracterizada pela redução da sensibilidade de um microrganismo patogênico a uma droga específica (PONTE-SUCRE et al., 2017), resultando na diminuição da eficácia do fármaco em uma população que antes era suscetível (PONTE-SUCRE et al., 2017). No entanto, essa definição pressupõe a suscetibilidade original dos parasitos à droga e isso pode não ocorrer em parasitos do gênero *Leishmania* (PONTE-SUCRE, 2003; PONTE-SUCRE et al., 2017). Diversos fatores podem acabar por influenciar no fenótipo de resistência a uma determinada droga (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; PONTE-SUCRE et al., 2017), entretanto, é a sensibilidade intrínseca do patógeno ao fármaco o fator crucial (CROFT et al, 2020).

Variações na susceptibilidade a diferentes fármacos, como o antimônio e a Anfotericina B, foram observadas em diversas cepas de *Leishmania* spp. (FERNANDEZ et al., 2014; FRANCO-MUÑOZ et al., 2018). Por exemplo, Franco-

Muñoz e colaboradores (2018) demonstraram a ocorrência de uma variabilidade interespecífica na sensibilidade contra a Anfotericina B em isolados de *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Fernández et al. (2014) também reportaram essa variação de suscetibilidade à miltefosina em cepas destas mesmas espécies em regiões da Colômbia. Apesar dessas variações, a terapia com MT demonstrou maior eficácia quando comparada ao antimoniato de meglumina (Glucantime®) (SOTO et al., 2004; SOTO et al., 2006; MACHADO et al., 2010).

Espada et al. (2014) avaliaram a suscetibilidade à miltefosina em 10 isolados clínicos de *Leishmania (V.) braziliensis* de quatro estados do Brasil (Pará, Tocantins, Bahia e Goiás). Nesse estudo, os valores de EC50 (concentração da droga que inibe a viabilidade celular em 50%) foram determinados tanto para as formas promastigotas quanto para as formas amastigotas dos parasitos. Embora tenha sido observada uma variabilidade intraespecífica em ambos os estágios, as formas amastigotas mostraram-se significativamente mais sensíveis à droga em comparação com suas respectivas formas promastigotas (ESPADA et al., 2014).

Mais recentemente, Espada et al. (2021) também avaliaram a sensibilidade à miltefosina em isolados de *Leishmania (L.) infantum* obtidos de 60 pacientes e 13 cães com LV. Este estudo determinou valores de EC50 e observou uma variabilidade intra-específica em promastigotas e amastigotas. Vale destacar que 11 isolados desse estudo eram provenientes de pacientes do Maranhão, e esses isolados estão depositados na Coleção de *Leishmania* da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ – RJ). Apesar da amostragem representativa do estado mais estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar o fenótipo de sensibilidade de isolados locais à esta droga.

Com o intuito de estudar o fenômeno de tolerância à miltefosina, alguns estudos têm utilizado parasitos resistentes à droga. Em linhagens resistentes, observa-se a redução no acúmulo intracelular da droga (PEREZ-VICTORIA et al., 2001; PEREZ-VICTORIA et al., 2003b; SEIFERT et al., 2003). Perez-Victoria e colaboradores (2001) mostraram que a superexpressão da glicoproteína-P (também conhecida como MDR-1) aumenta a tolerância de *Leishmania (L.) tropica* à MT através do transporte do fármaco do meio intracelular. Posteriormente, Perez-Victoria et al. (2003) observaram que a resistência à MT também está associada com mutações no gene codificador do transportador de miltefosina.

Vale destacar que apenas o transportador de MT, por si só, não é capaz de exercer a atividade de translocação de fosfolipídios e da miltefosina pela membrana plasmática (PEREZ-VICTORIA et al., 2001). A subunidade β (LdRos3) desta proteína participa efetivamente do fenótipo de sensibilidade à droga. A ausência, defeito ou baixo nível de expressão dessa subunidade pode acarretar na resistência à MT (PEREZ-VICTORIA et al., 2006a). Além disso, fatores intrínsecos da droga também contribuem para o surgimento de parasitos resistentes, como: longo tempo de tratamento e também a elevada meia-vida da droga (150 – 200 h) (PÉREZ-VICTORIA et al. 2006b). Diante disso, destaca-se a relevância de pesquisas que avaliem a sensibilidade dos isolados à miltefosina, bem como os mecanismos envolvidos, especialmente em áreas endêmicas.

2.5 Genômica de *Leishmania*

Diferentes espécies de *Leishmania* apresentam variação no número de cromossomos e na composição de seus conjuntos de genes (PEACOCK et al., 2007; SANTI et al., 2022). Por exemplo, *Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) infantum* possuem 36 cromossomos, enquanto *Leishmania (V.) braziliensis* apresenta 35 e *Leishmania (L.) mexicana*, 34. O primeiro genoma de *Leishmania* sequenciado no Brasil foi o de *Leishmania (L.) amazonensis*, em 2013. Essa espécie, apesar de semelhante a *Leishmania (L.) mexicana*, possui famílias de proteínas exclusivas, possivelmente associadas à sua distribuição geográfica (REAL et al., 2013).

Além das diferenças genômicas, há genes espécie-específicos que codificam proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro e na sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos (PEACOCK et al., 2007). A formação de pseudogenes e a perda de genes também desempenham um papel fundamental na evolução dos genomas de diferentes espécies de *Leishmania* (PEACOCK et al., 2007).

O genoma de *Leishmania* é altamente plástico, permitindo variações no número de cópias de genes, duplicações, deleções e amplificações gênicas (UBEDA et al., 2008; TOSI et al., 2023). Essas variações podem alterar a dosagem gênica e acredita-se que contribuam para a plasticidade fenotípica dentro das populações do parasita (SANTI et al., 2022). No entanto, os mecanismos que regulam essa

plasticidade e suas consequências ainda não estão completamente esclarecidos (TOSI et al., 2023).

A plasticidade genética também está diretamente associada à resistência a medicamentos (REIS-CUNHA et al., 2017; SANTI et al., 2022). A variação genética é um dos principais fatores responsáveis pelo surgimento de fenótipos resistentes (REIS-CUNHA et al., 2017; SANTI et al., 2022). Isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) panamensis* resistentes ao Glucantime® apresentaram alterações na somia cromossômica e no número de cópias de genes em comparação às linhagens suscetíveis (PATINO et al., 2019). Em *Leishmania (L.) donovani*, a resistência à anfotericina B foi atribuída ao aumento da expressão do gene de resistência a múltiplas drogas *MDR1* (PURKAIT et al., 2012). Além disso, a perda do gene que codifica a 24-esterol metiltransferase (*SMT*) também foi associada à resistência *in vitro* de *Leishmania (L.) donovani* à anfotericina B (RASTROJO et al., 2018).

A eficácia reduzida da miltefosina em isolados brasileiros de *Leishmania (L.) infantum* tem sido associada à perda do *Lócus de Sensibilidade à Miltefosina* (MSL), localizado no cromossomo 31 do parasita (CARNIELLI et al., 2018). Além disso, mutações no transportador de miltefosina também foram relacionadas à resistência a esse fármaco (FERNANDEZ-PRADA et al., 2016). Por outro lado, pesquisas recentes indicam que a amplificação do gene *Ros3 (Lem3p/CDC50)* em isolados clínicos de *Leishmania (V.) braziliensis* aumenta a captação de miltefosina, tornando esses parasitas mais sensíveis ao tratamento (ESPADA et al., 2021).

Diante dessas evidências, a compreensão detalhada do genoma de *Leishmania* é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle da leishmaniose. Isso inclui o aprimoramento de diagnósticos, vacinas e terapias inovadoras. Além disso, a investigação dos mecanismos de expressão gênica e regulação é fundamental para a identificação de alvos terapêuticos e estratégias para combater a resistência aos medicamentos, contribuindo para um manejo mais eficaz da doença.

2.6 *Locus* MSL

Um fato relevante acerca da Miltefosina foi sua baixa eficácia no tratamento de pacientes com LV no Brasil. Um estudo de ensaio clínico com pacientes brasileiros realizado em 2005 para avaliar a eficácia e segurança do fármaco no tratamento da leishmaniose visceral mostrou resultados insatisfatórios com taxas de cura de aproximadamente 60% (CARNIELLI et al., 2019).

Explicações para este fenômeno incluem a possível existência de uma resistência natural à MT na população de parasitos circulantes no Brasil. Com isso, para testar essa hipótese, trabalhos posteriores utilizando a abordagem de estudo de associação genômica ampla (GWAS, sigla do inglês *Genome-wide association study*) investigaram possíveis variações genômicas do parasito associadas com a falha no tratamento dos pacientes brasileiros (CARNIELLI et al., 2018). A amostra incluiu 26 isolados clínicos de pacientes que participaram do ensaio clínico. Este estudo demonstrou que a deleção do *locus* MSL (*Locus de Sensibilidade à Miltefosina*, do inglês *Miltefosine Sensitive Locus*) no genoma do parasita está significativamente associada à falha no tratamento com miltefosina (CARNIELLI et al., 2018).

O *locus* MSL está localizado no cromossomo 31 (tetrassômico) do parasito *Leishmania (L.) infantum*, que, de acordo com estudos anteriores, geralmente apresenta de três a cinco cópias (DOWNING et al., 2011). Considerado geneticamente estável, esse *locus* contém quatro genes: *LINF_310031200* e *LINF_310031300*, que codificam as enzimas 3'-nucleotidase/nuclease (NUC1 e NUC2, respectivamente); *LINF_310031400*, que codifica uma proteína semelhante a helicase (HLP); e *LINF_310031500*, responsável pela codificação da 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (TEI) (CARNIELLI et al., 2018). Esses genes desempenham funções essenciais, como a helicase, que atua na replicação do DNA, e a 3,2-trans-enoil-CoA isomerase, fundamental para a oxidação de ácidos graxos, um processo crítico para a gliconeogênese nas formas amastigotas do parasito (PHILIPP SCHWABL et al., 2021).

O mecanismo de perda do MSL em *Leishmania (L.) infantum* foi investigado por meio do sequenciamento das novas junções de nucleotídeos formadas após a deleção desse *locus*, revelando que a deleção ocorreu na mesma posição em todos os isolados (CARNIELLI et al., 2018). Acredita-se então que a nova junção criada após a deleção do MSL corresponde aos elementos repetitivos que compõem o grupo

de alinhamento repetido RAG337, conforme descrito por Ubeda et al. (2014). Esse processo de deleção provavelmente se dá por recombinação homóloga, envolvendo a região de Retrotransposon degenerado intercalado curto SIDER2, que flanqueiam o MSL (CARNIELLI et al., 2018; PHILIPP SCHWABL et al., 2021). Além disso, análises genéticas sugerem que, uma vez perdido, o *locus* MSL dificilmente é reintroduzido na população, o que pode ter um impacto duradouro na capacidade do parasito de responder ao tratamento com miltefosina.

A importância dos quatro genes do *locus* para a suscetibilidade dos parasitos à miltefosina foi posteriormente testada por Carnielli et al. (2022) utilizando a tecnologia de CRISPR-Cas9. Por meio da edição de DNA com o sistema CRISPR os quatro genes foram deletados individualmente ou em combinação e a interferência dessa deleção foi avaliada no fenótipo dos parasitos. As deleções de NUC1 e NUC2 foram associadas a uma diminuição na suscetibilidade à miltefosina, indicando que os produtos transcritos desses genes apresentam um papel na susceptibilidade a esse fármaco (CARNIELLI et al., 2018; PHILIPP SCHWABL et al., 2021).

Análises metabolômicas dos mutantes nocauteados demonstraram aumento do seu conteúdo lipídico, dentre eles o ergosterol, sugerindo que esse lipídio pode se ligar à miltefosina e reter o fármaco na membrana do parasito, contribuindo assim para a resistência à miltefosina. Adicionalmente, isolados clínicos de pacientes que recidivaram após o tratamento com miltefosina (sem o MSL) demonstraram modular o acúmulo de óxido nítrico favoravelmente à sua sobrevivência dentro do macrófago hospedeiro, ou seja, os parasitos que não possuem o *locus* MSL apresentam maior resistência às alterações no metabolismo lipídico provocadas pelo medicamento (CARNIELLI et al., 2022).

Assim, é possível entender melhor interferência dos genes constituintes do *locus* MSL no fenótipo de resistência dos parasitos de *Leishmania infantum* à miltefosina, bem como é evidenciada a necessidade de novos estudos que explorem melhor as possíveis consequências da deleção do MSL.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre a deleção do *locus* MSL e a resistência *in vitro* à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com leishmaniose visceral em zona endêmica.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de crescimento *in vitro* de isolados de *Leishmania (L.) infantum*;
- Determinar a sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* a miltefosina em formas promastigotas e amastigotas;
- Correlacionar a presença/ausência do *locus* gênico MSL com a sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos.

REFERÊNCIAS

ALONSO, L. et al. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n.1-2, p. 391-398, 2012.

ARRUDA, C. C. P. et al. Comportamento biológico de *Leishmania* (L.) *amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 33-40, jan./mar. 2010.

AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

BERMAN, J. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*, v.6, n.8, p.1381-1388. 2005.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970, 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade, Brasília: Ministério da Saúde, 78p, 2011.

BRASIL. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1. ed., rev. e Brasília: Ministério da Saúde, 2015

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRACHWITZ, H.; VOLLGRAF, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacology & therapeutics**, v. 66, n. 1, p. 39-82, 1995.

BREISER, A. et al. Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. **Lipids**, v.22, n.11, Nov, p.925-926. 1987.

BRYCESON, A.; Tropical medicine for the 21st century. Tropical medicine should be concerned with medical problems endemic to the tropics. **BMJ** 312(7025): 247, 1996.

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, 2018.

CARNIELLI, J. B. T. *et al*, Natural Resistance of Leishmania infantum to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789–794, 2019.

CARVALHO, E.M. *et al*. Immunoregulation in leishmaniasis. **Ciência e Cultura J. Braz Assoc Adv Scien**, v.46, p. 441-445, 1994.

CASTANYS-MUÑOZ, E. *et al*. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite Leishmania with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3573-3579, 2008.

COSTA, J. M. L. *et al*. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, Supl. 3, p. 16-24, 2009.

COELHO, A. C. Miltefosine susceptibility and resistance in leishmania: from the laboratory to the field. **Journal of Tropical Diseases**, v. 4, n. 02, p. 2-6, 2016.

CROFT, S. L. *et al*. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 16, p. 2633- 2636, 1987.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recente advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 44 2003.

CROFT, S. L. *et al*. Drug Resistance in Leishmaniasis, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CHRISTENSEN, S. M. *et al*. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by L. amazonensis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

DA LUZ, R. I. *et al*. In vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5197–5203, 2009.

DE SOUZA, M. A. *et al*. Human Visceral Leishmaniasis: from diagnosis to treatment. **FACENE**, p.1-9, 2012. Disponível em: http://www.facene.com.br/wp-content/uploads/2010/11/Leishmaniose-visceral-humana_com corre-%E2%94%9C%C2%BA%E2%94%9C%C3%81es-dos-autores_25.10.12-PRONTO.p f. Acesso em: 21 de set. de 2024.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the

treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DORLO, Thomas PC et al. Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 1, p. 146- 153, 2014.

EBERHARDT, E. et al, Miltefosine enhances the fitness of a non-virulent drug-resistant *Leishmania infantum* strain, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. 395–406, 2018.

ENGEL, J. Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). **TDR News**, v.68, p.5. 2002

ESPADA, C. R. et al, In Vitro Susceptibility to Miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) Isolates from Different Geographical Areas in Brazil, **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1228–1228, 2021.

ESPECIAL, N. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde, [s.l.: s.n.], 2021.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.

ESCOBAR, P. et al, Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B, **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 151–157, 2002.

FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.

FERNÁNDEZ, Olga Lucía et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2871, 2014.

FERREIRA, B. A. et al, Isolation, typing, and drug susceptibility of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* isolates from dogs of the municipality of Embu das Artes, an endemic region for canine leishmaniasis in Brazil, **Parasitology Research**, v. 121, n. 9, p. 2683–2695, 2022.

FERREIRA, B. A. et al, In vitro miltefosine and amphotericin B susceptibility of strains and clinical isolates of *Leishmania* species endemic in Brazil that cause tegumentary leishmaniasis, **Experimental Parasitology**, v. 246, p. 108462, 2023.

FERREIRA, B. A. et al, Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: In vitro and in vivo characterization of a Brazilian clinical isolate, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 5, p. e0012175, 2024.

FISCHER, Corey; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 1, p. 85-87, 2001.

FRANCO-MUÑOZ, C. et al. Intraspecies differences in natural susceptibility to amphotericin B of clinical isolates of *Leishmania* subgenus *Viannia*. **Plos One**, v. 13, n. 4, p. 1-15, 26 abr. 2018.

GANGULY, N. K. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. **TDR News**, n.68, p.2. 2002.

GOTO, H. et al. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

HADIGHI, Ramtin et al. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. **PLoS medicine**, v. 3, n. 5, p. e162, 2006.

IVENS, Alasdair C et al, The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*, *Science*, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JONES, Caitlin M.; WELBURN, Susan C.; JONES, Joshua D. Treatment failure of pentavalent antimonial therapy for human visceral leishmaniasis: a meta-analysis. **Journal of Global Health Reports**, v. 3, 2019.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P. et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

KARVAR, Mehran et al. The efficacy, relapse and failure in the treatment of anthroponotic cutaneous leishmaniasis with intralesional glucantime along with cryotherapy. **Journal of Kerman University of Medical Sciences**, v. 23, n. 2, p. 156- 163, 2016.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Transmission of leishmaniasis by the bite of phlebotomine sandflies: possible mechanisms. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 152-154, 1981

KUHLENCORD, A. et al. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.8, Aug, p.1630-1634.1992.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 795 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, dec. 2012.

MEMBRIVE, N. A. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 0, 2017.

MONDELAERS, A. et al. Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired

Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes, **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154101–e0154101, 2016.

MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

NATERA, S. et al. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 637–642, 2007.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.754-765, set. 2008. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809>. OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257– 266, 2004.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: A literature review with emphasis on clinical aspects. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 8, p. 553–562, 2000.

PARIS, Caroline *et al*, Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PATINO L. H., Muskus C., Muñoz M., Ramírez J. D. (2020). Genomic Analyses Reveal Moderate Levels of Ploidy, High Heterozygosity and Structural Variations in a Colombian Isolate of Leishmania (Leishmania) Amazonensis. **Acta Trop.** 203, 105296.

PEACOCK, Christopher S et al, Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease, *Nature Genetics*, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PÉREZ-VICTORIA, F.J. et al. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resistance Updates**. v.9, p. 26-39, 2006a.

PÉREZ-VICTORIA, F. Javier et al. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 33, p. 23766-23775, 2006b.

PÉREZ-VICTORIA, José M. et al. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrugresistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2468- 2474, 2001.

PHILIPP SCHWABL *et al*, Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas, **Communications biology**, v. 4, n. 1, 2021.

PIGOTT, D. M. *et al*. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 27, n.3, p.1-21, jun. 2014.

PONTE-SUCRE, A. *et al*. Drug Resistance in *Leishmania* Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments, 1a edição. Springer, 2013.

RAKOTOMANGA, M. *et al*. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

REY, L. *Leishmania* e leishmanioses. In: Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4 ed., Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2016. ISBN: 9788627718028.

REIS-CUNHA, J. L.; VALDIVIA, Hugo O ; BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira, Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids, **Current Genomics**, v. 19, n. 2, 2017

RITTIG, M.G ; BOGDAN, C, *Leishmania*–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views, **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

Ruiz-Postigo, J. A., Grout, L., e Jain, S. (2020). Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 95, 265–280.

SANTOS, G. A. *et al*, Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host, **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 430–430, 2023.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Reviews of infectious diseases**, v. 7, n. 5, p. 625-634, 1985.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SACKS, David L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

SOTO, J. *et al*. Breve Relatório: Eficácia do Miltefosine para Leishmaniose Cutânea Boliviana. **Am J Trop Med Hyg**. 2008; 78 : 210–211.

STROPPIA, Pedro HF *et al*. Effect of 1, 2, 3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034-3045, 2017.

SEIFERT, K. et al, Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine), **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 4, p. 380–387, 2003.

SEIFERT, K. et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30, n. 3, p. 229-235, 2007.

SUNDAR, Shyam *et al*, Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis, **The Lancet**, v. 352, n. 9143, p. 1821–1823, 1998.

SUNDAR, S. et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann Trop Med Parasitol**, v.93, n.6, Sep, p.589-597. 1999.

SUNDAR, Shyam et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104-1107, 2000.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis, **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, Shyam *et al*, Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis, **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739–1746, 2002.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. Supplement_1, p. S26-S33, 2006.

SUNDAR, Shyam; CHATTERJEE, Mitali. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 345, 2006.

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.

SUNYOTO, Temmy; POTET, Julien; BOELAERT, Marleen. Why miltefosine—a lifesaving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. **BMJ global health**, v. 3, n. 3, p. e000709, 2018.

SCHWABL, P. et al. Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 29 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

SRIVASTAVA, S. et al, Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India, **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

SHIRZADI, Mohammad Reza. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, v. 10, p. 11, 2019.

THAKUR, C. P. et al. Leishmania species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 187-189, 2001.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

T'KINDT, R. *et al.* Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 904, 2010.

UBEDA, Jean-Michel et al, Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy, **Genome biology**, v. 9, n. 7, 2008.

UBEDA, J.M. *et al.* Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite Leishmania. **PLoS Biol.** 2014;12(5):e1001868.

WHO, World Health Organization. Leishmaniasis. **WHO**. 2022. Disponível em: . Acesso em setembro de 2024.

WORLD, **Leishmaniasis**, Who.int, disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. acesso em: 8 out. 2024.

WORTMANN, Glenn et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028, 2010.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 95(1):S27-S58,

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido na Revista: Acta Tropica.

Qualis: A2

CAPÍTULO I - Artigo a ser submetido na Revista: Acta Tropica. Qualis A2**Associação da deleção gênica no *locus* de sensibilidade à Miltefosina em *Leishmania (Leishmania) infantum* com resistência a miltefosina**

Ana Jessica Sousa Coelho^{a,b}; Juliana Mendes Sousa^c; Anna Clara Vieira Pinto^b;
Thaiza Carvalho de Sousa^b; Beatriz Simonsen Stolf^c; Danniel C. Jeffares^e;
Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo^a; Juliana Brambilla Carnielli
Trindade^d; Mayara Ingrid Sousa Lima^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

^bUniversidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia, São Luís, MA, Brasil

^cUniversidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, São Paulo, SP, Brasil

^dYork Biomedical Research Institute, Departamento de Biologia, Universidade de York, Reino Unido

^eCentro de Imunologia e Infecção, Departamento de Biologia, Universidade de York, Reino Unido

Autor correspondente:

Mayara Ingrid Sousa Lima. Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís, MA, Brasil. CEP 65080-805. E-mail: mayara.ingrid@ufma.br

Abstract:

Fundo: A miltefosina tem sido utilizada no tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil. No entanto, ensaios clínicos de fase II indicaram baixa eficácia desse fármaco no tratamento da leishmaniose visceral (LV), sugerindo a existência de fatores genéticos do parasito associados à falha terapêutica. Estudos recentes demonstraram que isolados clínicos de *Leishmania infantum* provenientes de pacientes não responsivos apresentavam alterações genômicas relacionadas à resistência medicamentosa, incluindo a deleção do *Miltefosine Sensitivity Locus* (MSL).

Objetivos: Investigar a relação entre a deleção do *lôcus* MSL e a resistência *in vitro* à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com leishmaniose visceral em zona endêmica.

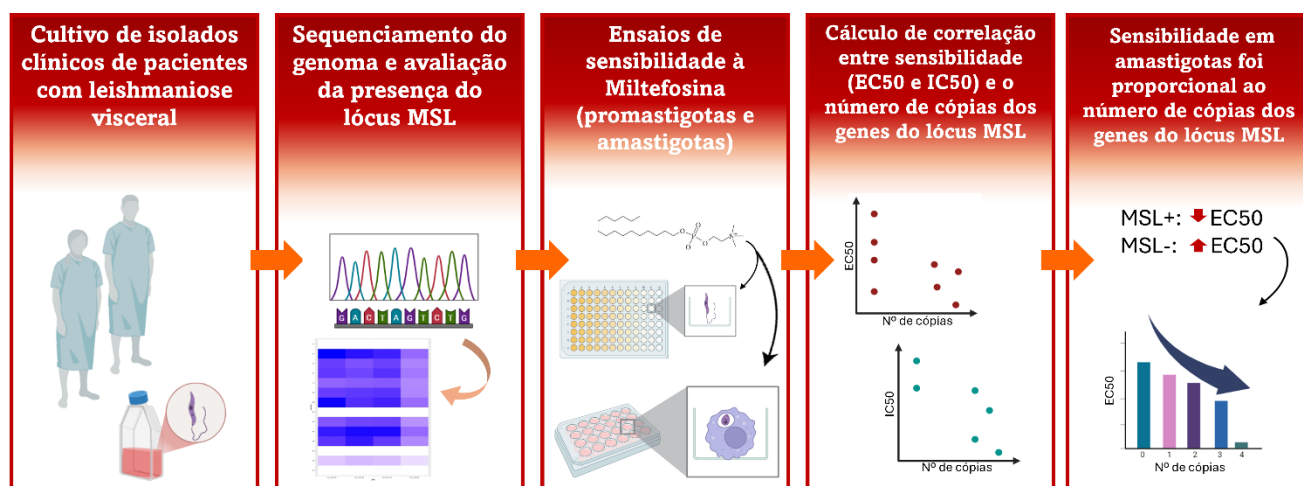
Principais conclusões: Os isolados de *Leishmania (L.) infantum*, na forma amastigota intracelular, mais tolerantes à miltefosina (EC_{50} : $6,02 \pm 0,32 \mu M$ a $7,36 \pm 0,71 \mu M$), apresentavam ausência do *lôcus* MSL ($p < 0,0001$), confirmando a associação entre a deleção desse *lôcus* e a resistência à miltefosina. Além disso, demonstramos uma correlação negativa entre o número de cópias gênicas do MSL e a susceptibilidade à miltefosina, assim, quanto menor o número de cópias do gene mais sensível foi o isolado. A compreensão desse mecanismo é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra a leishmaniose visceral, bem como para incluir o *screening* prévio do *lôcus* MSL como marcador de resistência e eficácia do tratamento.

Palavras-chave: isolados clínicos, suscetibilidade, leishmaniose visceral, alta endemia

Highlights

1. Isolados de *Leishmania infantum* sem o *lôcus* MSL são mais tolerantes à miltefosina.
2. Há uma correlação negativa entre o número de cópias de genes no *lôcus* MSL e a sensibilidade à miltefosina.
3. Em áreas de alta endemia circulam isolados de *Leishmania infantum* resistentes à miltefosina.

Graphical abstract



1. INTRODUÇÃO

A diversidade de manifestações e desfechos clínicos em infecções por *Leishmania* sp. é resultante de uma série de determinantes envolvendo desde fatores ligados à interação parasita-hospedeiro, ao *background* genético do hospedeiro e sua condição imunológica, até fatores intrinsecamente relacionados ao parasita como virulência e resistência a drogas (MURRAY et al., 2005; BAPTISTA-FERNANDES et al., 2006; BURZA et al., 2018). Estudos amplos de caracterização de isolados clínicos revelam como a heterogeneidade fenotípica de parasitos advindos de amostras de campo refletem a variabilidade intra-específica destes organismos a diversos parâmetros, como por exemplo a cinética de crescimento *in vitro*, a resistência à lise por sistema complemento e a patogenicidade *in vivo* em camundongos (FRANSSEN et al., 2020; ATTIA et al., 2022). Essa heterogeneidade também se manifesta na susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de diferentes espécies de *Leishmania* sp. a fármacos convencionais, como os antimoniais pentavalentes, a Anfotericina B e a Miltefosina (UTALE et al., 2013; COSER et al., 2021)

Entre os tratamentos disponíveis para a leishmaniose, a Miltefosina (MT) é o único medicamento administrado por via oral. No entanto, observa-se uma variação na susceptibilidade à droga em diferentes cepas de *Leishmania spp.*. Fernández et al. (2014) relataram diferenças na sensibilidade à Miltefosina entre isolados de *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* em regiões da Colômbia. Espada et al. (2021) também avaliaram a sensibilidade à Miltefosina em isolados de *Leishmania (L.) infantum* provenientes de 60 pacientes e 13 cães com leishmaniose visceral (LV) e este estudo determinou valores de EC50 e demonstrou uma variabilidade intraespecífica em promastigotas e amastigotas.

Um fato relevante acerca da MT foi sua baixa eficácia no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral no Brasil. Um ensaio clínico realizado em 2005 para avaliar a eficácia e segurança do fármaco apresentou resultados insatisfatórios, com uma taxa de cura de aproximadamente 60% (CARNIELLI et al., 2019). Uma das possíveis explicações para esse fenômeno é a presença de uma resistência natural à droga entre os parasitos circulantes no país.

A resistência medicamentosa se tornou um dos principais desafios no manejo das leishmanioses, sendo caracterizada pela redução da sensibilidade de um

microrganismo patogênico a uma droga específica (PONTE-SUCRE et al., 2017), resultando na diminuição da eficácia do fármaco em uma população que antes era suscetível (PONTE-SUCRE et al., 2017). Diversos fatores podem influenciar no fenótipo de resistência a uma determinada droga, entre eles, alterações genéticas nos parasitos (OUELLETTE et al., 2004; PONTE-SUCRE et al., 2017; SANTOS et al., 2023). Carnielli et al. (2018), em estudo de associação genômica ampla (GWAS) por meio do sequenciamento do genoma completo de 26 isolados de *Leishmania (L.) infantum*, identificaram um marcador genético significativamente associado à falha nos tratamentos da leishmaniose visceral com miltefosina. A deleção envolve um *locus* específico, denominado MSL (*Locus de Sensibilidade à Miltefosina*) (CARNIELLI et al., 2018).

O *locus* MSL está localizado no cromossomo 31 (tetrassômico) de *Leishmania (L.) infantum* e é considerado geneticamente estável. Ele compreende quatro genes: LINF_310031200 e LINF_310031300, codificando 3'-nucleotidase/nuclease (NUC1 e NUC2, respectivamente); LINF_310031400, codificando uma proteína semelhante a helicase (HLP); e LINF_310031500, codificando 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (TEI) (CARNIELLI et al., 2018). Esses genes desempenham papéis fundamentais na captação, síntese e metabolismo de lipídios, componentes essenciais para a integridade da membrana celular (CARNIELLI et al., 2022). A deleção do MSL ocorre, provavelmente, por recombinação homóloga envolvendo a região de retroposon degenerado intercalado curto SIDER2, descrita por Ubeda et al. (2014), que flanqueia a região do *locus* (CARNIELLI et al., 2018).

Compreender a relação entre a deleção do *locus* MSL e seus impactos no desfecho clínico dos pacientes pode contribuir para a otimização das estratégias terapêuticas. Assim, este estudo avalia a presença/ausência do *locus* MSL e sua relação com a sensibilidade *in vitro* à Miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* provenientes de pacientes com LV no estado do Maranhão, uma região de alta endemia para a doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Os aspirados de medula óssea foram obtidos de dez pacientes com suspeita ou diagnóstico de LV, seguindo as conformidades do Manual do Ministério da Saúde

(2006). Todos os procedimentos realizados para obtenção das amostras foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob protocolo nº 3.921.086. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os isolados clínicos foram devidamente cadastrados na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob protocolo nº 8839. Adicionalmente, todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo seguiram as diretrizes estabelecidas na Lei 11.794/2008 e obtiveram a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o processo de nº 23115.006029/2022-27.

2.2 Isolamento e cultivo do parasito

O isolamento dos parasitos foi realizado através de diluição seriada do aspirado de medula em placa de 24 poços (Kasvi, PR, Brasil) contendo meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Gibco™) e 1% de solução antibiótica penicilina/estreptomicina (100X) (Gibco™). Após a observação de estágios flagelados dos parasitos em cultura, estes foram repicados para garrafas de cultura T-25 (KASVI). Formas promastigotas da cepa referência de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e dos isolados clínicos foram cultivadas em Meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco™), 0.3 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 40 mL de HEPES 1 M (pH 7,4) (Sigma), 20 mL de adenina 5mM (Sigma) e 20 µg/mL de solução antibiótica gentamicina (Sigma) em estufa a 25±1°C. Os repiques foram realizados semanalmente durante a fase logarítmica de crescimento dos parasitos. Os 10 isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* utilizados neste trabalho estão armazenados no biorrepositório LabGeM/UFMA.

2.3 Cultivo e plaqueamento de macrófagos murinos

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado por calor, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, e mantida em estufa a 37°C e 5% CO₂. Repiques foram realizados a cada 2 dias.

Macrófagos de camundongos Swiss foram coletados por lavagem peritoneal utilizando uma seringa de 10mL (BD) contendo meio RPMI 1640 (Gibco™) gelado.

A suspensão celular foi transferida para tubos de 15 mL e centrifugada a 1.500 rpm durante 15 minutos a 4°C. O pellet obtido foi ressuspensionado em 10mL de meio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco™).

2.4 Fármaco

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi adquirida da companhia Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA). A solução estoque 10 mM foi preparada para diluição da droga em água ultrapura Milli-Q e posterior filtração utilizando um filtro de seringa de 0.22 µm (KASVI) e armazenamento a 4°C até a sua utilização.

2.5 Extração de DNA

Um total de 1×10^8 parasitos/mL foram coletados e lavados 2 vezes com PBS estéril por centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. A lise das células foi realizada com solução de lise (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10%) e proteinase K (20 mg/mL) (Promega™). As amostras foram incubadas em banho maria a 52°C *overnight*. Em seguida, foi adicionada solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a homogeneização foi feita cuidadosamente por inversão. Posteriormente, amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo álcool isopropílico para precipitação. Logo após, foi realizada nova centrifugação e o pellet lavado com etanol 70%. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 1 hora a -20°C e logo após centrifugadas utilizando as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado em temperatura ambiente até a evaporação do álcool residual. O DNA foi diluído em 50 µL de solução TE (Tris-HCl/EDTA). A concentração e a pureza do DNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Spectrophotometer, Uniscience). As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

2.6 Curva de crescimento *in vitro*

A curva de crescimento foi determinada para cinco isolados clínicos, selecionados randomicamente dentre os dez utilizados neste estudo. Após sincronização seguindo metodologia de Tano (2022), foi feito um subcultivo com inóculo inicial de 5×10^5 parasitos/mL. Em seguida, a quantidade de parasitos de cada

garrafa foi contada diariamente por sete dias em hemocítômetro de Neubauer. Três curvas de crescimento independentes foram geradas para cada isolado clínico.

2.7 Identificação do Locus MSL no genoma dos isolados clínicos por bioinformática

Os parasitos foram previamente sequenciados na Universidade de York (Grace et al., 2022) . A plataforma Galaxy foi utilizada para as análises (usegalaxy.eu ou usegalaxy.org). O genoma de referência *Leishmania infantum* JPCM5 v.46 foi obtido do banco de dados públicos tritrypdb.org, no formato *fasta*. Os dados de sequenciamento do genoma completo dos isolados foram carregados no formato FASTQ e estão disponíveis no *Sequence Read Archive* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o *BioProject* ID PRJNA781413. Para mapeamento e determinação das sequências referentes ao *locus* MSL utilizou-se o algoritmo BWA-MEM (*Burrows-Wheeler Aligner*), presente no servidor Galaxy. Após isso, para a leitura de cobertura foi criado um arquivo “*bed*” e definidas as regiões do genoma para estimar a cobertura de leitura. O arquivo criado incluía as coordenadas de quatro genes na região MSL e as coordenadas dos genes de cada lado (próximos ao MSL), por exemplo, 10 genes *upstream* e 10 genes *downstream* ao *locus* MSL. Em seguida, executou-se a ferramenta “*samtools bedcov*” usando este arquivo “*bed*” e o arquivo “*bam*”. Isso gerou informações de cobertura sobre as regiões especificadas no arquivo *bed*. Cobertura zero em cepas MSL-, cobertura total em cepas MSL+ e cobertura parcial em heterozigotos e/ou população mista para a presença do MSL. A saída do software foi traçada através do pacote R (versão 4.3.2 usando Rstudio).

2.8 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à miltefosina em promastigotas e amastigotas intracelulares

O ensaio colorimétrico de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difenilformazan) foi utilizado para determinar a sensibilidade de formas promastigotas da cepa referência e dos isolados clínicos à miltefosina seguindo protocolo estabelecido por Zauli-Nascimento et al. (2010). Cerca de 1×10^6 promastigotas/poço foram incubados à uma série crescente de concentrações do fármaco (0-200 μ M) durante 24 horas em estufa a 25°C (ESPADA et al.2020). Após o período de incubação, foi adicionado 30 μ L de MTT (5mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e, após 3 horas, 50 μ L de solução 20% de SDS (dodecil sulfato de sódio). A leitura da densidade óptica foi realizada em

leitor de microplacas Ez Read 400 (Biochrom, Cambridge, UK), nos comprimentos de onda 595 nm e 690 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata. Os valores de IC₅₀ foram determinados através de curvas de regressão sigmoidal utilizando o software GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Para avaliar a suscetibilidade à droga na forma amastigota intracelular, cerca de 4×10^5 de macrófagos/poços (macrófagos peritoneais de camundongos Swiss ou macrófagos de RAW 264.7) foram semeados em placa de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro (13 mm) estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂ durante 24 horas. A infecção dos macrófagos foi realizada com parasitos na fase estacionária de crescimento em uma proporção de 15:1 (parasitos:macrófago) durante 24 horas nas mesmas condições de incubação. Os parasitos não fagocitados foram retirados através de lavagens com PBS estéril. As células infectadas foram incubadas com uma série crescente de miltefosina diluída em meio RPMI (0,7 - 20 μ M) e colocadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ durante 72 horas (ESPADA et al. 2020). Em seguida, as lamínulas foram fixadas em metanol 100% e coradas com solução Giemsa (Sigma) a 10%. O percentual de inibição foi determinado por contagem direta (100 macrófagos/lamínula), em microscópio óptico, e utilizado para calcular o EC₅₀. Os ensaios foram realizados independentemente duas vezes em triplicata.

2.9 *Análise estatística*

Para os cálculos de EC₅₀, foram realizadas regressões sigmoidais utilizando o software GraphPad Prism 8.0. A análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett, foi empregada para identificar diferenças significativas entre a cepa referência MHOM/BR/74/PP75 e os isolados clínicos, utilizando o mesmo software. Além disso, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a correlação de Spearman foram conduzidos no software IBM SPSS Statistics, versão 22.0.

3. RESULTADOS

3.1 *Caracterização epidemiológica dos isolados*

Os dez isolados utilizados neste estudo foram obtidos de dez pacientes provenientes de seis municípios do estado do Maranhão, sendo a maioria provenientes do município de São Luís (Fig.1). Todos os pacientes tinham histórico prévio de notificação da doença. Esses isolados já haviam sido previamente caracterizados como *Leishmania (L.) infantum* em estudos anteriores (Grace et al., 2022). Dentre eles, apenas o isolado PV050 foi obtido de um paciente que havia recebido tratamento prévio para leishmaniose visceral, com Anfotericina B Lipossomal (AmB-L) como terapia. No entanto, nenhum dos dez pacientes havia sido tratado com Miltefosina antes ou após a coleta dos isolados.

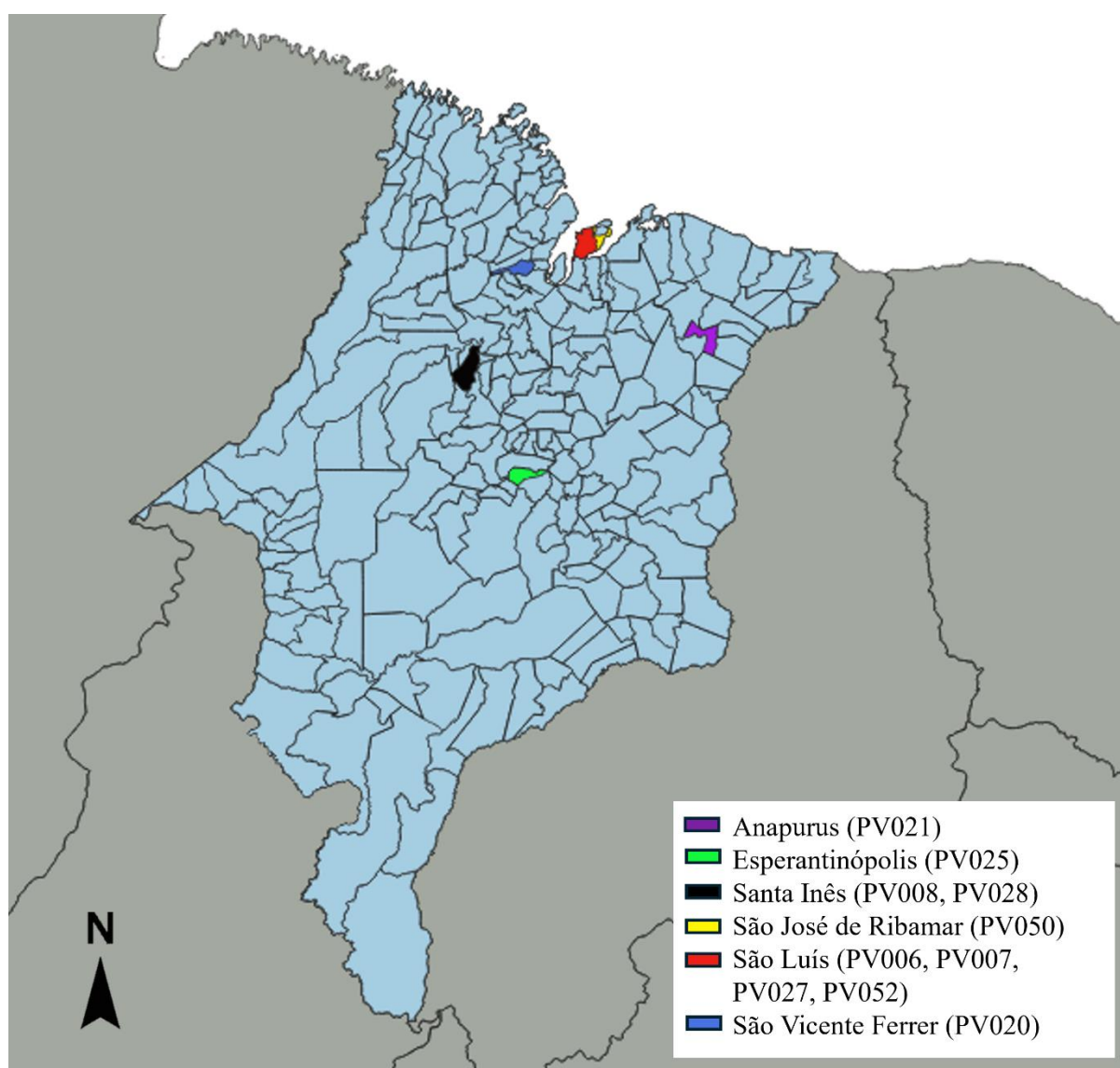


Fig. 1. Distribuição geográfica da origem dos isolados clínicos no estado do Maranhão. Mapa gerado no software QGIS 3.10.10.

3.2 Curva de crescimento *in vitro*

Foi determinada a curva de crescimento de cinco isolados clínicos, selecionados dentre os dez utilizados neste estudo, ao longo de um período de sete dias, utilizando-se um inóculo inicial de 5×10^5 parasitos/mL (Fig. 2A). Os resultados evidenciaram padrões distintos de crescimento entre os isolados de *Leishmania infantum* ao longo do período de observação. Cada isolado apresentou taxas de crescimento variáveis; no entanto, foi observado um aumento significativo na densidade parasitária entre o quarto e o quinto dia de cultivo. Dentre os isolados analisados, PV007 e PV025 destacaram-se por apresentar maior densidade parasitária em comparação aos demais, alcançando, no quinto dia, aproximadamente 6×10^7 parasitos/mL (Fig. 2A). Em contraste, os isolados PV020, PV021 e PV050 exibiram um crescimento mais lento durante o mesmo período.

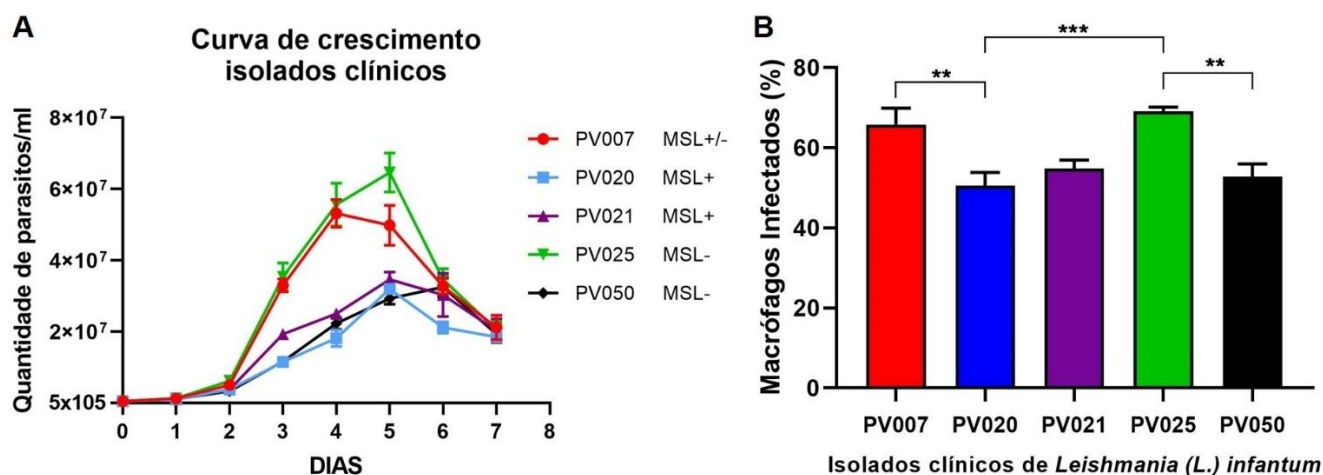


Fig.2. Curva de crescimento e taxa de infecção de cinco isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*. (A) Curva de crescimento. Os dados representam a média de três curvas de crescimento obtidas em experimentos independentes. (B) Percentual de infecção de macrófagos RAW 264.7 por isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*.

3.3 Presença/ausência do *lôcus* MSL nos isolados clínicos

As análises realizadas indicaram que quatro isolados de *Leishmania infantum* (PV006, PV008, PV025 e PV052) apresentaram cobertura nula ou próxima de zero para todos os genes do *lôcus* MSL, confirmando a deleção completa deste *lôcus* (Fig. 3A). Um isolado (PV007) apresentou cobertura parcial, com valor intermediário de profundidade de leitura (0,534) no sítio de deleção do cromossomo 31 (Fig. 3B). Os demais isolados, que apresentaram cobertura genômica total, foram classificados como portadores do *lôcus* MSL.

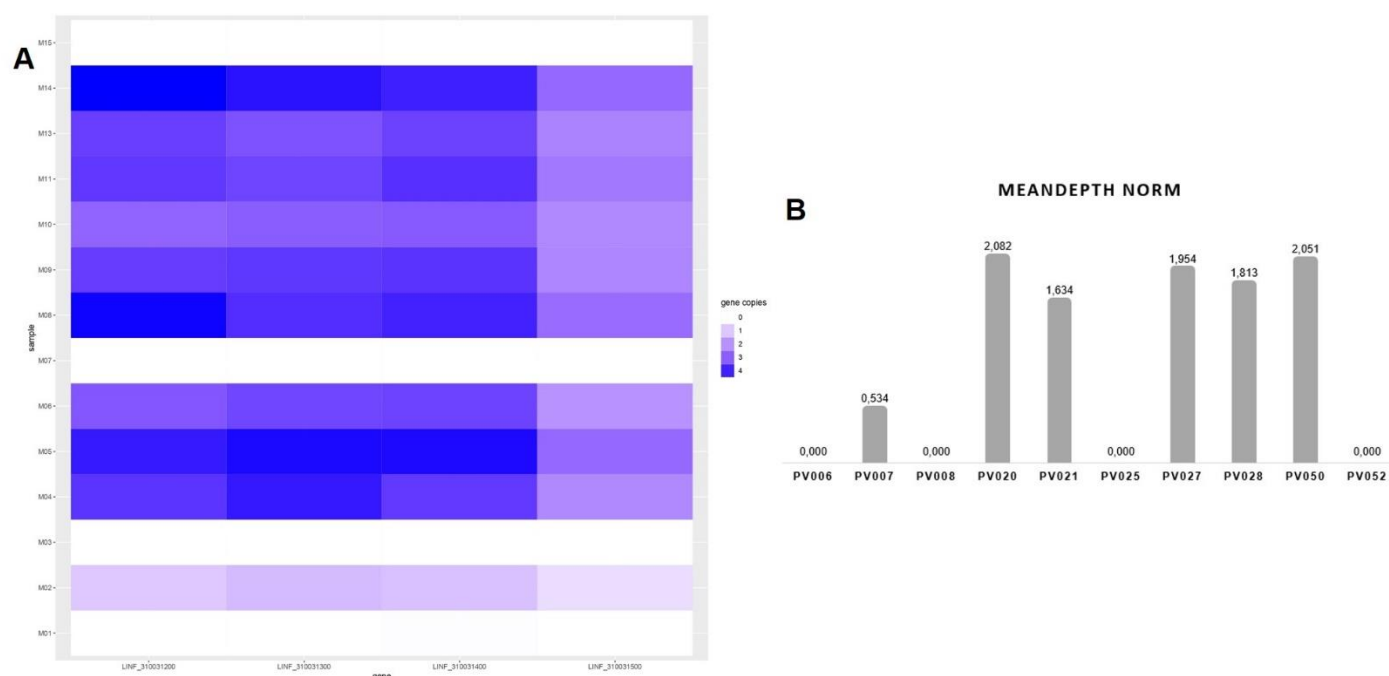


Fig. 3. Análise da presença e ausência do *lôcus* MSL por bioinformática. (A) Número de cópias dos quatro genes nos isolados, incluindo os 10 isolados selecionados para este estudo, calculado pela divisão da profundidade média (MeanDepth) pela cobertura média do genoma (GenomeCoverage) (B) Média entre os valores de cobertura normalizada dos genes MSL: gene: $\approx 2 = 4$ cópias; $\approx 1 = 2$ cópias; $\approx 0,5 =$ heterozigoto; $0 =$ nenhuma cópia/deleção.

3.4 Ensaios de suscetibilidade

Neste estudo, investigamos a suscetibilidade intrínseca de 10 isolados clínicos à MT, uma vez que nenhum deles havia sido previamente exposto ao tratamento com este fármaco. Inicialmente, a suscetibilidade *in vitro* foi avaliada em formas promastigotas dos isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*. Para fins comparativos, foram realizados também ensaios com a cepa de referência MHOM/BR/74/PP75. Os valores de IC50 obtido para a cepa de referência MHOM/BR/74/PP75 foi $7,84 \pm 1,52 \mu\text{M}$ e os IC50 dos isolados clínicos variaram entre $5,84 \pm 0,12 \mu\text{M}$ e $25,17 \pm 3,80 \mu\text{M}$ (Tabela 1). Oito dos 10 isolados apresentaram valores de IC50 superiores aos da cepa de referência (somente PV020 e PV027 tiveram IC50 menor). Diferenças estatisticamente significativas nos valores de IC50 foram observadas para os isolados PV006, PV007, PV008, PV021 e PV052, quando comparados com a cepa de referência ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$), conforme demonstrado na Tabela 1.

Em seguida, a suscetibilidade em formas amastigotas intracelulares foi determinada. A taxa de infecção da cepa de referência (MHOM/BR/74/PP75) foi de

52,33%, enquanto a infectividade dos isolados clínicos variou entre 50,5% e 88,33% (Tabela 1). O valor de EC50 para a cepa de referência MHOM/BR/74/PP75 foi $1,91 \pm 0,56 \mu\text{M}$ e os EC50 dos isolados clínicos variaram de $1,56 \pm 0,03 \mu\text{M}$ a $7,36 \pm 0,71 \mu\text{M}$ (Fig. 4C). De forma semelhante, a maioria dos isolados (9 de 10) apresentou valores de EC50 superiores aos da cepa de referência. Novamente o isolado PV20 teve EC50 menor que o da PP75, sendo o mais sensível na forma amastigota. Diferenças estatisticamente significativas nos valores de EC50 foram identificadas para os isolados PV006, PV007, PV008, PV025, PV027, PV028 e PV052 ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$), quando comparados com a cepa de referência (Tabela 1). Todos os isolados foram mais sensíveis na forma amastigota quando comparados com a forma promastigota.

Tabela 1. Atividade da MT em formas promastigotas e amastigota da cepa referência e dos isolados clínicos utilizados no estudo.

Cepa/isolado clínico	Identificação na análise por bioinformática	Promastigota IC50 ± DP (µM)	IR	Amastigota EC50 ± DP (µM)	IR	MI* (%)	MSL
MHOM/BR/74/PP75	-----	7,84 ± 1,52	-----	1,91 ± 0,56	-----	52,33%	-----
MHOM/BR/2018/PV006	M01	20,09 ± 2,88 ***	2,56	7,29 ± 0,58 ****	3,81	86,67%	MSL-
MHOM/BR/2018/PV007	M02	17,12 ± 1,30 **	2,18	7,14 ± 0,15 ****	3,73	65,83%	MSL+/-
MHOM/BR/2018/PV008	M03	25,17 ± 3,80 ****	3,21	7,12 ± 0,47 ****	3,72	88,33%	MSL-
MHOM/BR/2018/PV020	M05	7,31 ± 0,84	0,93	1,56 ± 0,03	0,81	50,5%	MSL+
MHOM/BR/2018/PV021	M06	20,23 ± 4,25 ***	2,58	2,46 ± 0,01	1,28	54,83%	MSL+
MHOM/BR/2019/PV025	M07	12,07 ± 0,78	1,53	6,02 ± 0,32 ****	3,15	69,17%	MSL-
MHOM/BR/2019/PV027	M08	5,84 ± 0,12	0,74	3,88 ± 0,05 **	2,03	80,67%	MSL ⁺
MHOM/BR/2019/PV028	M09	13,01 ± 0,52	1,65	4,23 ± 0,25 ***	2,21	62,00%	MSL ⁺
MHOM/BR/2019/PV050	M14	9,23 ± 0,07	1,17	2,05 ± 0,09	1,07	52,83%	MSL+
MHOM/BR/2019/PV052	M15	15,33 ± 1,30*	1,95	7,36 ± 0,71 ****	3,85	78,66%	MSL ⁻

Valores de IC50 e EC50 obtidos por média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. IR: índice de resistência – razão entre o valor de IC50 e EC50 do isolado clínico e da cepa de referência. DP: desvio padrão. MI* (%) - percentual de macrófagos infectados. Diferenças significativas estão expressas na tabela como: * p < 0,05 , ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 em comparação a cepa referência MHOM/BR/74/PP75.

3.5 Associação entre o *locus* MSL e a sensibilidade à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania infantum*

Nossos resultados não revelaram diferenças significativas na taxa de infectividade entre parasitos portadores MSL+ ou não portadores MSL- do *locus* MSL. Na forma promastigota, não foi identificada uma relação direta entre os valores de IC50 para miltefosina e a presença/ausência do *locus* MSL (Fig. 4A), sugerindo que a deleção desse *locus* não influencia a sensibilidade à droga nessa fase extracelular do parasito.

Entretanto, a análise da forma amastigota intracelular revelou uma diferença estatisticamente significativa nos valores de EC50 entre parasitos MSL+ e MSL- (Fig. 4A). Os isolados clínicos com deleção do *locus* MSL apresentaram valores mais elevados de EC50, indicando maior tolerância à miltefosina. Esses resultados sugerem que a ausência do *locus* MSL pode estar associada a uma redução na eficácia do fármaco especificamente na fase intracelular do parasito.

Um achado interessante desse estudo descreve a relação entre o número de cópias gênicas do *locus* MSL e a sensibilidade *in vitro* à miltefosina. Para essa análise, o teste de normalidade indicou que das três variáveis analisadas - *Meandepth norm*, IC50 em promastigotas (μM) e EC50 em amastigotas intracelulares (μM) — apenas *Meandepth norm* não apresentou distribuição normal ($W = 0,782$; $p = 0,009$), enquanto IC50 em promastigotas ($W = 0,971$; $p = 0,897$) e EC50 em amastigotas intracelulares ($W = 0,857$; $p = 0,070$) possuem normalidades.

Assim, as correlações entre as variáveis indicaram uma correlação negativa, moderada e significativa entre *Meandepth norm* e IC50 em promastigotas ($\rho = -0,760$; $p = 0,011$) (Fig. 4B). Além disso, a correlação entre *Meandepth norm* e EC50 em amastigotas intracelulares foi negativa, alta e estatisticamente significativa ($\rho = -0,821$; $p = 0,004$) (Fig. 4C). Esses achados sugerem que o aumento no número de cópias do *locus* MSL está associado a uma maior sensibilidade à miltefosina, especialmente na fase intracelular do parasito.

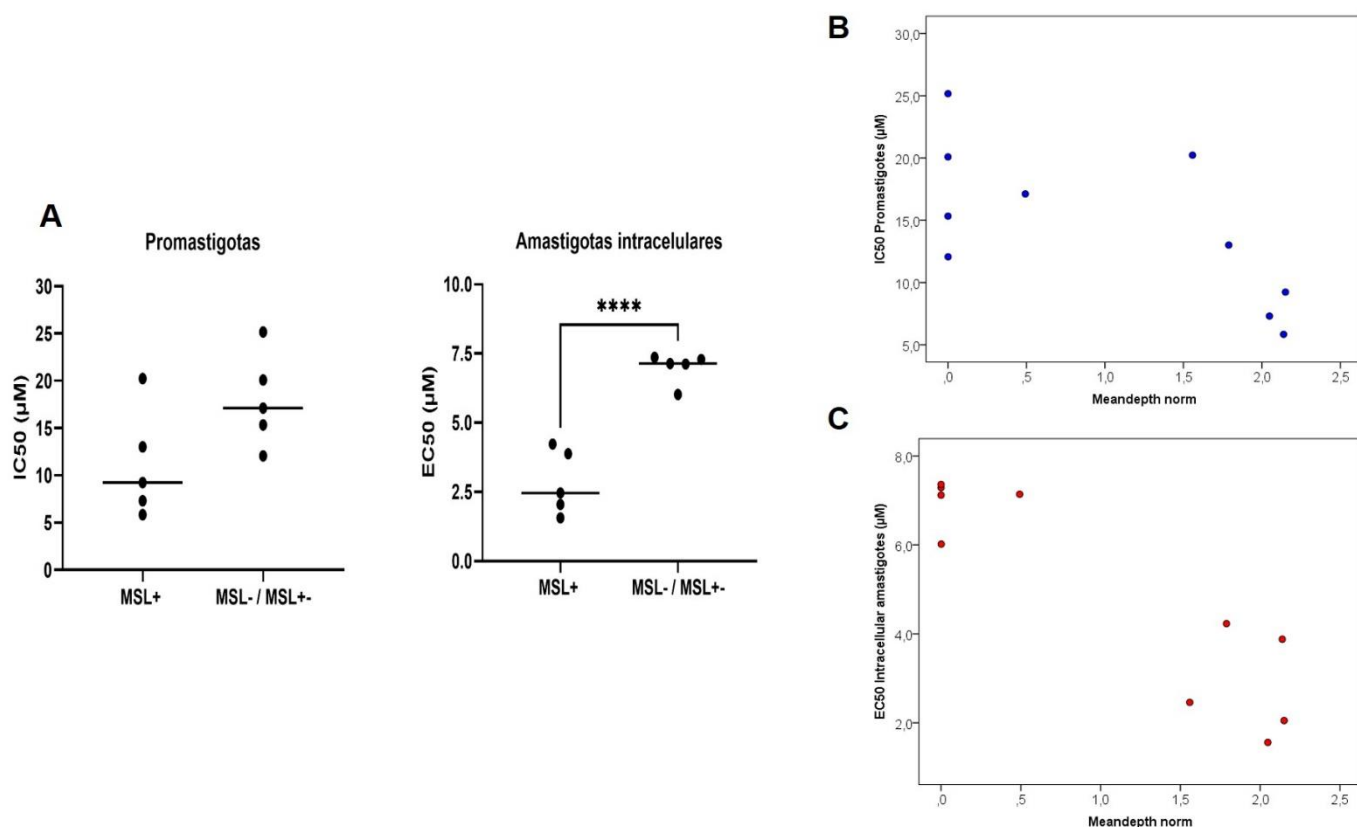


Fig.4. (A) Susceptibilidade à miltefosina em cepas de *Leishmania (L.) infantum* com presença (MSL+) ou ausência (MSL-) do *lôcus* MSL. Os valores de IC50/EC50 foram determinados para promastigotas e amastigotas, sendo analisada a associação entre esses valores e o perfil genotípico do *lôcus* MSL. A linha central nos gráficos indica a mediana dos valores observados para cada grupo (B) e (C) Gráfico de correlação entre número de cópias do *lôcus* MSL e a sensibilidade *in vitro* à Miltefosina. Meandepth norm e IC50 Promastigota ($\rho = -0,760^*$ $p = 0.011$) Meandepth norm e EC50 Amastigota ($\rho = -0,821^{**}$ $p = 0.004$).

4. DISCUSSÃO

A miltefosina (MT) tem sido amplamente empregada no tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil. Contudo, um ensaio clínico de fase II realizado no Brasil revelou uma eficácia limitada desse fármaco no tratamento da leishmaniose visceral (LV). Estudos recentes apontaram que isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*, obtidos de pacientes não responsivos à terapia, apresentaram alterações genômicas associadas à resistência natural a esse medicamento (CARNIELLI et al 2018 e 2019). A resistência natural à MT vem sendo descrita em regiões endêmicas para leishmaniose. Srivastava et al. (2017) na Índia relataram valores de EC50 para amastigotas de *Leishmania (L.) donovani* dez vezes maiores que o da cepa de referência. De forma similar, Espada et al. (2017) relataram baixa sensibilidade à

droga em isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* obtidos de pacientes com leishmaniose tegumentar (LT), sem exposição prévia à MT.

A deleção do *Lócus* de Sensibilidade à Miltefosina (MSL) foi identificada como um dos mecanismos genômicos que conferem resistência a esta droga (CARNIELLI et al 2018). Carnielli et al. (2022) utilizaram CRISPR-Cas9 para avaliar a importância dos quatro genes do *lócus* na suscetibilidade de *Leishmania* à miltefosina. Uma das hipóteses levantada é que a deleção de dois desses genes leva ao aumento do conteúdo lipídico, incluindo ergosterol, que pode reter a miltefosina na membrana do parasito e contribuir para a resistência. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre a deleção do *lócus* MSL e a resistência in vitro à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum* de pacientes com leishmaniose visceral em zona endêmica.

Em nosso trabalho foram avaliados isolados clínicos provenientes de pacientes sem nenhuma exposição prévia à MT. 4 dos 10 isolados clínicos apresentaram deleção completa do *lócus* e 1 isolado apresentou cobertura parcial, de onde podemos levantar duas hipóteses: ou há uma prevalência de parasitos com deleção subcromossômica heterozigótica, ou a amostra é composta por uma população mista de parasitos MSL-/MSL+. A coexistência de populações mistas pode impactar a virulência do parasita, gerando variações fenotípicas que auxiliam sua adaptação a diferentes condições ambientais e fisiológicas, dificultando o controle e tratamento da infecção, e ampliando os desafios terapêuticos (Shaw et al., 2016). Entretanto, para estudar possíveis diferenças fenotípicas e de fitness adaptativo em populações mistas de parasitos, são necessárias mais investigações com maior número de amostras MSL-/MSL+.

Adicionalmente, realizamos uma análise do padrão de crescimento de cinco isolados clínicos de *Leishmania (L.) infantum*. Embora todos os isolados tenham mantido a morfologia típica de promastigotas no meio de cultivo, observamos diferenças significativas nas taxas de crescimento. Os isolados PV020, PV021 e PV050 apresentaram crescimento mais lento em comparação com PV007 e PV025, atingindo o pico de densidade e a forma estacionária somente no quinto dia. Além disso, os isolados de crescimento mais lento também apresentaram menor capacidade de infecção em ensaios in vitro, quando macrófagos foram infectados com parasitos na fase estacionária como observado pelas diferenças de %MI na Tabela 1 e na Fig 2 B. Não foram observados padrões de maior ou menor infectividade

relacionados ao status de presença/ausência do *lócus*. Diferenças no crescimento de isolados da mesma espécie já foram relatadas na literatura, como no estudo de Burguete-Mikeo et al. (2023), que observou variações de crescimento em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de mamíferos naturalmente infectados.

Os ensaios de sensibilidade *in vitro* demonstraram variações nos valores de IC50 entre os isolados. Os valores de IC50 de promastigotas variaram entre $5,84 \pm 0,12$ e $25,17 \pm 3,80$ μM . Esses achados são comparáveis aos reportados por Espada et al. (2021), que observaram variações de IC50 entre 5,89 e 23,7 μM . Além disso, nós demonstramos que as formas amastigotas dos isolados também apresentaram variação na sensibilidade à MT. O EC50 dos isolados variaram de $1,56 \pm 0,03$ a $7,36 \pm 0,71$ μM . Ao comparar a EC50 de diferentes fármacos em isolados de *Leishmania (L.) infantum* do Uruguai, Faral-Tello et al. (2020) relataram valores de EC50 para MT variando entre 3,4 e 5,3 μM . De forma semelhante, Espada et al. (2021) identificaram valores de EC50 de magnitude comparável em formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, oscilando entre 1,41 e 4,57 μM . No presente estudo, observamos que as formas promastigotas apresentaram maior tolerância ao fármaco em comparação às formas amastigotas correspondentes. Essa diferença já tinha sido observada anteriormente por diversos autores (Santa-Rita et al., 2000; Escobar et al., 2002; Azzouz et al., 2005; Espada et al., 2014; Obonaga et al., 2014). De acordo com Azzouz et al. (2005), essa discrepância pode ser explicada pelo efeito da miltefosina, que potencializa a citotoxicidade dos macrófagos, facilitando assim a eliminação do parasita dentro da célula hospedeira infectada.

Acerca da sensibilidade em formas promastigotas, os isolados PV027 e PV020, ambos MSL+, foram os mais sensíveis na forma promastigota. Por outro lado, o isolado PV08, caracterizado como MSL-, apresentou o maior valor de IC50 nesta mesma forma. Em relação às formas amastigotas, os dois isolados mais sensíveis foram novamente isolados positivos para o *lócus* MSL, sendo eles PV020 e PV050. Concomitantemente, PV052 (MSL-) apresentou a maior tolerância na forma amastigota do parasito. Esses resultados sugerem uma possível associação entre a deleção do *lócus* MSL e a resistência ao fármaco. No entanto, nas formas promastigotas, não foi identificada uma associação significativa entre a presença ou ausência do *lócus* MSL e a suscetibilidade *in vitro* à miltefosina. Essa ausência de correlação sugere que outros mecanismos de resistência ou fatores regulatórios podem estar envolvidos durante a fase extracelular, evidenciando a complexidade

dos mecanismos de resistência à miltefosina nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasito.

Por outro lado, nas formas amastigotas, a correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Isolados com deleção do *lôcus* MSL apresentaram valores de EC50 mais elevados, indicando uma menor sensibilidade ao fármaco. Esses achados sugerem que a ausência do *lôcus* MSL está diretamente associada à resistência à miltefosina nas formas intracelulares amastigotas. Esta associação foi anteriormente descrita em isolados de *Leishmania (L.) infantum* brasileiros por Carnielli et al. 2019.

Esse resultado é particularmente relevante, dado que os isolados analisados provêm de uma área endêmica do nosso estado. No entanto, diferentemente de outros trabalhos, em nosso estudo identificamos de maneira inédita a correlação entre o número de cópias do gene MSL e a sensibilidade *in vitro* dos parasitos à MT. Foram observadas associações negativas entre o Meandepth norm e a sensibilidade à droga tanto em formas promastigotas (correlação moderada e significativa $\rho = -0,760$; $p = 0,011$) quanto amastigotas (correlação alta e significativa $\rho = -0,821$; $p = 0,004$) (Fig. 4A). Estes achados corroboram a hipótese de que a quantidade de cópias do MSL é inversamente proporcional à sensibilidade, reforçando o envolvimento do MSL em mecanismos de resistência à MT. Além disso, a correlação mais forte em formas amastigotas sugere que estes mecanismos podem ser mais relevantes no ambiente intracelular, entretanto novas investigações são necessárias para confirmar esta hipótese.

Avaliar o perfil de sensibilidade de isolados de *Leishmania spp.* circulantes em uma região endêmica é crucial, pois o conhecimento do fenótipo de sensibilidade permite a indicação mais adequada das abordagens terapêuticas. É importante destacar que os isolados testados nunca foram expostos à miltefosina, o que pode sugerir uma heterogeneidade na suscetibilidade natural dos parasitos. No entanto, após este estudo preliminar, será necessário aumentar o tamanho da amostra dos isolados analisados e caracterizar os isolados clínicos de forma pareada, antes e depois da exposição ao fármaco de escolha. Além disso, será importante selecionar isolados com maior tolerância para análises mais detalhadas, incluindo ensaios de virulência em modelos *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, analisamos a relação entre a deleção do *lôcus* MSL no genoma de *Leishmania (L.) infantum* e a resposta *in vitro* ao fármaco miltefosina. Identificamos que quatro isolados apresentavam a deleção completa do *lôcus*, um isolado possuía uma deleção parcial e cinco isolados mantinham o *lôcus* intacto. Observamos uma associação tanto qualitativa quanto quantitativa entre a presença/ausência do *lôcus* e a resistência ao fármaco. Isolados com a deleção do *lôcus* demonstraram maior resistência, enquanto os isolados MSL+ foram mais sensíveis. Além disso, verificamos que quanto maior o número de cópias do *lôcus* em um isolado, maior era sua sensibilidade à miltefosina. Esses achados são especialmente relevantes para regiões endêmicas, pois contribuem para a avaliação da viabilidade e eficácia de esquemas terapêuticos, auxiliando no desenvolvimento de estratégias mais adequadas para o tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- Attia, H., Sghaier, M. R., Bali, A., Guerfali, F. Z., Chlif, S., Atri, C., Belhaj-Hamida, N., Zaatour, A., Gharbi, A., Ben-Salah, A., Dellagi, K., & Laouini, D. (2022). Intra-Specific Diversity of *Leishmania major* Isolates: A Key Determinant of Tunisian Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Clinical Polymorphism. *Microorganisms*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030505>
- Azzouz, S., Maache, M., Garcia, R. G., & Osuna, A. (2005). Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofofosine. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96(1), 60–65. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960109.x>
- Baptista-Fernandes, T., Marques, C., Roos Rodrigues, O., & Santos-Gomes, G. M. (2007). Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2006.10.001>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. In *The Lancet* (Vol. 392, Issue 10151, pp. 951–970). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Carnielli, J. B. T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V. C., Carvalho, S. F. G., Damasceno, J. D., Brown, E., Dickens, N. J., Costa, D. L., Costa, C. H. N., Dietze, R., Jeffares, D. C., & Mottram, J. C. (2018). A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine*, 36, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.029>
- Carnielli, J. B. T., Dave, A., Romano, A., Forrester, S., de Faria, P. R., Monti-Rocha, R., Costa, C. H. N., Dietze, R., Graham, I. A., & Mottram, J. C. (2022). 3'Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine. *EBioMedicine*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104378>
- Carnielli, J. B. T., Monti-Rocha, R., Costa, D. L., Sesana, A. M., Pansini, L. N. N., Segatto, M., Mottram, J. C., Costa, C. H. N., Carvalho, S. F. G., & Dietze, R. (2019). Natural resistance of *leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 789–794. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949>
- Coser, E. M., Ferreira, B. A., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Lindoso, J. A. L., & Coelho, A. C. (2021). Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, 215. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105806>
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., & Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH 3 (edelfosine) and amphotericin B. In *Acta Tropica* (Vol. 81). www.parasitology-online.com
- Espada, C. R., de Castro Levatti, E. V., Boité, M. C., Lamounier, D., Alvar, J., Cupolillo, E., Costa, C. H. N., Rode, J., & Uliana, S. R. B. (2021). In vitro susceptibility to miltefosine of *leishmania infantum* (Syn. *l. chagasi*) isolates from different geographical areas in brazil. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061228>
- Espada, C. R., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M. L., De Araújo Pereira, L. I., De Carvalho, E. M., Machado, P. R., Schriefer, A., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Coelho, A. C., & Uliana,

- S. R. B. (2017). Susceptibility to miltefosine in Brazilian clinical isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(3), 656–659. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0811>
- Faral-Tello, P., Greif, G., Satragno, D., Basmadjian, Y., & Robello, C. (2020). *Leishmania infantum* isolates exhibit high infectivity and reduced susceptibility to amphotericin B. *RSC Medicinal Chemistry*, 11(8), 913–918. <https://doi.org/10.1039/d0md00073f>
- Fernández, O. L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodríguez, I., Gomez, M. A., & Saravia, N. G. (2014). Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>
- Franssen, S. U., Durrant, C., Stark, O., Moser, B., Downing, T., Imamura, H., Dujardin, J. C., Sanders, M. J., Mauricio, I., Miles, M. A., Schnur, L. F., Jaffe, C. L., Nasereddin, A., Schallig, H., Yeo, M., Bhattacharyya, T., Alam, M. Z., Berriman, M., Wirth, T., ... Cotton, J. A. (2020). Global genome diversity of the *leishmania donovani* complex. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.51243>
- Grace, C. A., Sousa Carvalho, K. S., Sousa Lima, M. I., Silva, V. C., Reis-Cunha, J. L., Brune, M. J., Forrester, S., de Maria Pedrozo, C., de Azevedo, S., Costa, D. L., Speed, D., Mottram, J. C., Jeffares, D. C., & Costa, C. H. N. (2022). Parasite Genotype Is a Major Predictor of Mortality from Visceral Leishmaniasis. *MBio*, 13(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.02068-22>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Murray 2005. *The Lancet*, 366.
- Obonaga, R., Fernández, O. L., Valderrama, L., Rubiano, L. C., Castro, M. D. M., Barrera, M. C., Gomez, M. A., & Saravia, N. G. (2014). Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *leishmania* subgenus *viannia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 144–152. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>
- Ouellette, M., Drummelsmith, J., & Papadopolou, B. (2004). Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7(4–5), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.07.002>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopolou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 11, Issue 12). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Santa-Rita, R. M., Santos Barbosa, H., De Nazareth, M., Meirelles, S. L., & De Castro, S. L. (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. In *Acta Tropica* (Vol. 75). www.elsevier.com
- Santos, G. de A., Sousa, J. M., Aguiar, A. H. B. M. de, Torres, K. C. S., Coelho, A. J. S., Ferreira, A. L., & Lima, M. I. S. (2023). Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 8, Issue 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8090430>

- Shaw, C. D., Lonchamp, J., Downing, T., Imamura, H., Freeman, T. M., Cotton, J. A., Sanders, M., Blackburn, G., Dujardin, J. C., Rijal, S., Khanal, B., Illingworth, C. J. R., Coombs, G. H., & Carter, K. C. (2016). In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: Genomic and metabolomic characterization. *Molecular Microbiology*, 99(6), 1134–1148. <https://doi.org/10.1111/mmi.13291>
- Srivastava, S., Mishra, J., Gupta, A. K., Singh, A., Shankar, P., & Singh, S. (2017). Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1969-z>
- Tano, F. T., Barbosa, G. R., de Rezende, E., Souza, R. O. O., Muxel, S. M., Silber, A. M., Palmisano, G., & Stolf, B. S. (2022). Proteome and morphological analysis show unexpected differences between promastigotes of *Leishmania amazonensis* PH8 and LV79 strains. *PLoS ONE*, 17(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271492>
- Ubeda, J. M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2014). Genome-Wide Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. *PLoS Biology*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001868>
- Utaile, M., Kassahun, A., Abebe, T., & Hailu, A. (2013). Susceptibility of clinical isolates of *Leishmania aethiopica* to miltefosine, paromomycin, amphotericin B and sodium stibogluconate using amastigote-macrophage in vitro model. *Experimental Parasitology*, 134(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.022>
- Zauli-Nascimento, R. C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K. U., Pereira, L. I. A., Pelli De Oliveira, M. A., Ribeiro-Dias, F., Dorta, M. L., & Uliana, S. R. B. (2010). In vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine and International Health*, 15(1), 68–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02414>



Guia para autores

Sobre a revista

- [Objetivos e âmbito de aplicação](#)
- [Tipos de artigo](#)
- [Avaliação por pares](#)
- [Acesso aberto](#)

Ética e políticas

- [Ética na publicação](#)
- [Declaração de submissão](#)
- [Autoria](#)
- [Alterações de autoria](#)
- [Declaração de interesses](#)
- [Fontes de financiamento](#)
- [Declaração de IA generativa na redação científica](#)
- [Preprints](#)
- [Uso de linguagem inclusiva](#)
- [Relatórios de análises baseadas em sexo e gênero](#)
- [Reivindicações jurisdicionais](#)
- [Estudos em humanos e animais](#)

Redação e formatação

- [Formato de arquivo](#)
- [Página de título](#)
- [Abstrair](#)
- [Keywords](#)
- [Destaques](#)
- [Resumo gráfico](#)
- [Unidades, códigos de classificação e nomenclatura](#)
- [Fórmulas matemáticas](#)
- [Tabelas](#)
- [Figuras, imagens e obras de arte](#)
- [IA generativa e figuras, imagens e obras de arte](#)
- [Material suplementar](#)
- [Vídeo](#)
- [Dados da pesquisa](#)
- [Declaração de dados](#)
- [Vinculação de dados](#)
- [Elementos de pesquisa](#)

- [Estrutura do artigo](#)
- [Referências](#)

Enviando seu manuscrito

- [Lista de verificação de envio](#)

After receiving a final decision

- [Article Transfer Service](#)
- [Publishing agreement](#)
- [License options](#)
- [Open access](#)
- [Permission for copyrighted works](#)
- [Proof correction](#)
- [Share Link](#)
- [Responsible sharing](#)

Resources for authors

- [Elsevier Researcher Academy](#)
- [Language and editing services](#)

Getting help and support

- [Author support](#)

Sobre a revista

Objetivos e âmbito de aplicação

Acta Tropica é uma revista internacional sobre doenças infecciosas que abrange ciências da saúde pública, entomologia médica e veterinária e pesquisa biomédica, com ênfase particular em tópicos relevantes para a saúde humana e animal.

Seu escopo inclui a biologia de patógenos e vetores, relações parasita-hospedeiro, mecanismos de patogenicidade, doença clínica e quimioterapia. Aceitamos contribuições em pesquisa básica ou aplicada em disciplinas como epidemiologia, ecologia de doenças, diagnóstico, intervenções e controle, resistência a medicamentos e inseticidas, modelagem matemática, saúde pública e ciências sociais, mudanças climáticas, taxonomia de parasitas e vetores, biologia, ecologia e comportamento, genômica de hospedeiros e parasitas, bioquímica, imunologia e testes de vacinas.

As contribuições podem ser na forma de artigos de pesquisa originais, artigos de revisão, comunicações curtas, artigos de opinião ou cartas aos Editores.

Somente manuscritos de alta importância científica e inovação serão considerados para publicação.

Critérios para rejeição sem revisão:

- Fora do escopo.
- Manuscritos de relevância internacional mínima, incluindo relatórios regionais e estudos de interesse local.

- Relatos de casos.
- Estratégias de controle de parasitas e vetores em estágios laboratoriais inconclusivos muito iniciais de desenvolvimento. Para estudos de controle vetorial, a validação de campo é necessária.
- Estudos de campo não replicados há pelo menos dois anos.
- Estudos que tratam de produtos naturais (por exemplo, extratos vegetais) não caracterizados do ponto de vista químico.
- Questões éticas, incluindo plágio, submissão do manuscrito a vários periódicos e falta de aprovação ética quando necessário.

Diretrizes importantes para aceitação

Os editores e o Conselho Editorial da *Acta Tropica* fornecem as seguintes diretrizes para ajudar os autores a preparar manuscritos de alta qualidade que possam ser considerados para publicação.

Maximize suas chances de aceitação, certificando-se de que seu manuscrito:

- Matches the scientific scope of the journal,
- Follows the instructions specified in Acta Tropica guide for authors,
- Presents results that significantly advance science including innovative new approaches,
- Meets quality standards of presentation and literature citation,
- Demonstrates potential health or biomedical impact.

The above points are critical for the publication of original papers. Be aware Editors carefully evaluate initial manuscript submissions and only those meeting the above criteria will be forwarded to review. If reviewed favourably and the authors seriously address all concerns, then chances of acceptance are increased.

Review and Opinion articles may be invited by the Editors in Chief or submitted by authors responding to a recognized need. Reviews are expected to carefully synthesize and discuss the literature and make recommendations to advance respective scientific fields. Reviews and Opinions submitted by authors without research experience on the topic covered by the manuscript will not be considered. Systematic reviews adhering to PRISMA guidelines and meta-analyses are welcome. For any inquiry about Reviews and Opinions please contact our Special Content Editor, Prof. John Beier.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

Article types

Acta Tropica publishes the following types of papers:

1. **Original research articles**
2. **Short Communications**
3. **Review articles**
4. **Opinion articles**
5. **Letters to the Editor**

Original research articles should report highly significant innovative results not previously published elsewhere. Original articles are limited to 7,000 words per article (all text excluding tables and figure legends). Short Communications should consist of original results or new methods within the scope of the journal. Short Communications need not be formally structured as full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension. Short Communications are limited to 3,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited by the Editors in Chief. Review articles should include insightful recommendations for future directions needed for achieving public health impacts. Review articles are limited to 15,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Opinion articles should include scientifically backed points of view regarding currently relevant, controversial or future-oriented topics pertinent to the scope of Acta Tropica. Note that only outlining recent advances in a given field is not acceptable for an Opinion article for Acta Tropica. Besides stimulating scientific discussion or future research, opinion articles should provide a novel conceptual framework for an old or timely issue. The authors should outline which research directions should be prioritized and highlight specific points explaining why they should be prioritized in the forthcoming years to achieve public health impact. Opinion articles are limited to 6,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcome. Letters on "hot topics" about parasite and vector biology, ecology, as well as epidemiology, control of infections, and public health are also welcome. Note that Letters to the Editors will also be externally reviewed but the decision to publish submitted letters rests with the Editors in Chief. A goal is to publish constructive letters that will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers. Letters to the Editor are limited to 2,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Peer review

This journal follows a single anonymized review process. Your submission will initially be assessed by our editors to determine suitability for publication in this journal. If your submission is deemed suitable, it will typically be sent to a minimum of two reviewers for an independent expert assessment of the scientific quality. The decision as to whether your article is accepted or rejected will be taken by our editors. Authors who wish to appeal the editorial decision for their manuscript may submit a formal appeal request in

accordance with the procedure outlined in [Elsevier's Appeal Policy](#). Only one appeal per submission will be considered and the appeal decision will be final.

Read more about [peer review](#).

Our editors are not involved in making decisions about papers which:

- they have written themselves.
- have been written by family members or colleagues.
- relate to products or services in which they have an interest.

Any such submissions will be subject to the journal's usual procedures and peer review will be handled independently of the editor involved and their research group. Read more about [editor duties](#).

Special issues and article collections

The peer review process for special issues and article collections follows the same process as outlined above for regular submissions, except, a guest editor will send the submissions out to the reviewers and may recommend a decision to the journal editor. The journal editor oversees the peer review process of all special issues and article collections to ensure the high standards of publishing ethics and responsiveness are respected and is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Ethics and policies

Ethics in publishing

Authors must follow ethical guidelines stated in [Elsevier's Publishing Ethics Policy](#).

Submission declaration

When authors submit an article to an Elsevier journal it is implied that:

- the work described has not been published previously except in the form of a preprint, an abstract, a published lecture, academic thesis or registered report. See our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).
- the article is not under consideration for publication elsewhere.
- the article's publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out.
- if accepted, the article will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder.

To verify compliance with our journal publishing policies, we may check your manuscript with our screening tools.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

1. The conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content.
3. Final approval of the version to be submitted.

Authors should appoint a corresponding author to communicate with the journal during the editorial process. All authors should agree to be accountable for all aspects of the work to ensure that the questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Changes to authorship

The editors of this journal generally will not consider changes to authorship once a manuscript has been submitted. It is important that authors carefully consider the authorship list and order of authors and provide a definitive author list at original submission.

The policy of this journal around authorship changes:

- All authors must be listed in the manuscript and their details entered into the submission system.
- Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should only be made prior to acceptance, and only if approved by the journal editor.
- Requests to change authorship should be made by the corresponding author, who must provide the reason for the request to the journal editor with written confirmation from all authors, including any authors being added or removed, that they agree with the addition, removal or rearrangement.
- All requests to change authorship must be submitted using [this form](#). Requests which do not comply with the instructions outlined in the form will not be considered.
- Only in exceptional circumstances will the journal editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors post acceptance.
- Publication of the manuscript may be paused while a change in authorship request is being considered.
- Any authorship change requests approved by the journal editor will result in a corrigendum if the manuscript has already been published.
- Any unauthorised authorship changes may result in the rejection of the article, or retraction, if the article has already been published.

Declaration of interests

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential competing interests include:

- Employment
- Consultancies
- Stock ownership
- Honoraria
- Paid expert testimony
- Patent applications or registrations
- Grants or any other funding

The [Declaration of Interests tool](#) should always be completed.

Authors with no competing interests to declare should select the option, "I have nothing to declare".

The resulting Word document containing your declaration should be uploaded at the "attach/upload files" step in the submission process. It is important that the Word document is saved in the .doc/.docx file format. Author signatures are not required.

We advise you to read our [policy on conflict of interest statements, funding source declarations, author agreements/declarations and permission notes](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of generative AI in scientific writing

Authors must declare the use of generative AI in scientific writing upon submission of the paper. The following guidance refers only to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process:

- Generative AI and AI-assisted technologies should only be used in the writing process to improve the readability and language of the manuscript.
- The technology must be applied with human oversight and control and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. Authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.
- Authors must not list or cite AI and AI-assisted technologies as an author or co-author on the manuscript since authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans.

The use of generative AI and AI-assisted technologies in scientific writing must be declared by adding a statement at the end of the manuscript when the paper is first submitted. The statement will appear in the published work and should be placed in a new section before the references list. An example:

- Title of new section: Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process.
- Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.

The declaration does not apply to the use of basic tools, such as tools used to check grammar, spelling and references. If you have nothing to disclose, you do not need to add a statement.

Please read Elsevier's author policy on the use of generative AI and AI-assisted technologies, which can be found in our [GenAI Policies for journals](#).

Please note: to protect authors' rights and the confidentiality of their research, this journal does not currently allow the use of generative AI or AI-assisted technologies such as ChatGPT or similar services by reviewers or editors in the peer review and manuscript evaluation process, as is stated in our [GenAI Policies for journals](#). We are actively evaluating compliant AI tools and may revise this policy in the future.

Preprints

Preprint sharing

Authors may share preprints in line with Elsevier's [article sharing policy](#). Sharing preprints, such as on a preprint server, will not count as prior publication.

We advise you to read our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).

Free preprint posting on SSRN

In support of [open science](#) this journal offers authors a free preprint posting service on [SSRN](#) to ensure early registration and dissemination of research and facilitate early citations and collaboration. Posting to SSRN is subject to SSRN's standard checks.

You will be provided with the option to release your manuscript on SSRN during the submission process. Agreeing to this option will have no effect on the editorial process or outcome, and your manuscript will remain publicly available and free to read on SSRN whether our editors accept or reject your manuscript.

You will receive an email when your preprint is posted online on SSRN and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned.

Corresponding authors must seek approval from all co-authors before agreeing to release a manuscript publicly on SSRN.

We advise you to read about [SSRN](#), including the [SSRN Terms of Use](#) and [SSRN FAQs](#) before selecting this option.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Authors should ensure their work uses inclusive language throughout and contains nothing which might imply one individual is superior to another on the grounds of:

- age
- gender
- race
- ethnicity
- culture
- sexual orientation
- disability or health condition

We recommend avoiding the use of descriptors about personal attributes unless they are relevant and valid. Write for gender neutrality with the use of plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default. Wherever possible, avoid using "he, she," or "he/she."

No assumptions should be made about the beliefs of readers and writing should be free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions.

These guidelines are meant as a point of reference to help you identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

There is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender. We offer the following guidance:

- Sex and gender-based analyses (SGBA) should be integrated into research design when research involves or pertains to humans, animals or eukaryotic cells. This should be done in accordance with any requirements set by funders or sponsors and best practices within a field.
- Sex and/or gender dimensions of the research should be addressed within the article or declared as a limitation to the generalizability of the research.
- Definitions of sex and/or gender applied should be explicitly stated to enhance the precision, rigor and reproducibility of the research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer.

We advise you to read the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER checklist \(PDF\)](#) on the EASE website, which offer systematic approaches to the use of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation.

For further information we suggest reading the rationale behind and recommended [use of the SAGER guidelines](#).

Definitions of sex and/or gender

We ask authors to define how sex and gender have been used in their research and publication. Some guidance:

- Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features such as chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy. A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth") and is in most cases based solely on the visible external anatomy of a newborn. In reality, sex categorizations include people who are intersex/have differences of sex development (DSD).
- Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society.

Jurisdictional claims

Elsevier respects the decisions taken by its authors as to how they choose to designate territories and identify their affiliations in their published content. Elsevier's policy is to take a neutral position with respect to territorial disputes or jurisdictional claims, including, but not limited to, maps and institutional affiliations. For journals that Elsevier publishes on behalf of a third party owner, the owner may set its own policy on these issues.

- Maps: Readers should be able to locate any study areas shown within maps using common mapping platforms. Maps should only show the area actually studied and authors should not include a location map which displays a larger area than the bounding box of the study area. Authors should add a note clearly stating that "*map lines delineate study areas and do not necessarily depict accepted national boundaries*". During the review process, Elsevier's editors may request authors to change maps if these guidelines are not followed.

- Institutional affiliations: Authors should use either the full, standard title of their institution or the standard abbreviation of the institutional name so that the institutional name can be independently verified for research integrity purposes.

Studies in humans and animals

Authors must follow [ethical guidelines](#) for studies carried out in humans and animals.

Studies in humans

Work which involves the use of human subjects should be carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki: [Ethical principles for medical research involving human subjects](#).

Manuscripts should follow the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) recommendations](#) for the conduct, reporting, editing and publication of scholarly work in medical journals and aim to be representative of human populations in terms of sex, age and ethnicity. [Sex and gender terms](#) should be used correctly, as outlined by WHO (World Health Organization).

Manuscripts must include a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and have been approved by the appropriate institutional committee(s). The statement should contain the date and reference number of the ethical approval(s) obtained.

Manuscripts must also include a statement that the privacy rights of human subjects have been observed and that informed consent was obtained for experimentation with human subjects.

This journal will not accept manuscripts that contain data derived from unethically sourced organs or tissue, including from executed prisoners or prisoners of conscience, consistent with recommendations by [Global Rights Compliance on Mitigating Human Rights Risks in Transplantation Medicine](#). For all studies that use human organs or tissues, sufficient evidence must be provided that these were procured in line with [WHO Guiding Principles on Human Cell, Tissue and Organ Transplantation](#). The source of the organs or tissues used in clinical research must be transparent and traceable. If your manuscript describes organ transplantation you must additionally declare within the manuscript that:

- autonomous consent free from coercion was obtained from the donor(s) or their next of kin.
- organs and/or tissues were not sourced from executed prisoners or prisoners of conscience.

Studies in animals

All animal experiments should comply with [ARRIVE \(Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments\) guidelines](#).

Studies should be carried out in accordance with [Guidance on the operation of the Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986](#) and associated guidelines, [EU Directive 2010/63 for the protection of animals used for scientific purposes](#) or the [NIH \(National Research Council\) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) (PDF) or those of an equivalent internationally recognized body.

The sex of animals, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study must be indicated and a statement included in your manuscript that such guidelines as listed above have been followed.

Writing and formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Remove any strikethrough and underlined text from your manuscript, unless it has scientific significance related to your article.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our [Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#).

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the

work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract which does not exceed 250 words. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using "and" or "of").

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word "highlights" included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Graphical abstract

You are required to provide a graphical abstract at submission.

The graphical abstract should summarize the contents of your article in a concise, pictorial form which is designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract will help draw more attention to your online article and support readers in digesting your research. Some guidelines:

- Submit your graphical abstract as a separate file in the online submission system.
- Ensure the image is a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more and is readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi.
- Our preferred file types for graphical abstracts are TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

We encourage you to view example [graphical abstracts](#) and read about the benefits of including them.

Units, classifications codes and nomenclature

This journal requires you to use the international system of units (SI) which follows internationally accepted rules and conventions. If other units are mentioned within your article, you should provide the equivalent unit in SI.

Math formulae

- Submit math equations as editable text, not as images.
- Present simple formulae in line with normal text, where possible.
- Use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms such as X/Y.
- Present variables in italics.
- Denote powers of e by exp.
- Display equations separately from your text, numbering them consecutively in the order they are referred to within your text.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.
- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.

- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions for all figures, images, and artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as "graphics."
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).
- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionally large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork, which can be found in Elsevier's [GenAI Policies for Journals](#). This policy states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.
- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.
- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our guidelines on [submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option C: Research data deposit, citation and linking

You are **required** to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.
- Cite and link to this dataset in your article.
- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data statement

To foster transparency, you are required to state the availability of any data at submission.

Ensuring data is available may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you can state the reason why (e.g., your research data includes sensitive or confidential information such as patient data) during the submission process. This statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Read more about the importance and benefits of providing a [data statement](#).

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

- Divide your article into clearly defined and numbered sections. Number subsections 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), then 1.2, etc.
- Use the numbering format when cross-referencing within your article. Do not just refer to "the text."
- You may give subsections a brief heading. Headings should appear on a separate line.
- Do not include the article abstract within section numbering.

Theory and calculation

The theory section should lay the foundation for further work by extending the background you provided in the introduction to your article. The calculation section should represent a practical development from a theoretical basis.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using [CRediT \(Contributor Roles Taxonomy\)](#) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT](#) and [view an example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

- Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.
- Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.
- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add "unpublished results" or "personal communication."

- References cited as "in press" imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced.

Reference format

This journal does not set strict requirements on reference formatting at submission. Some guidelines:

- References can be in any style or format as long as the style is consistent.
- Author names, journal or book titles, chapter or article titles, year of publication, volume numbers, article numbers or pagination must be included, where applicable.
- Use of DOIs is recommended.

Our journal reference style will be applied to your article after acceptance, at proof stage. If required, at this stage we will ask you to correct or supply any missing reference data.

Reference style

All citations in the text should refer to:

- Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication.
- Two authors: both authors' names and the year of publication.
- Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations can be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: "as demonstrated (Allan, 2020a, 2020b; Allan and Jones, 2019)" or "as demonstrated (Jones, 2019; Allan, 2020). Kramer et al. (2023) have recently shown".

The list of references should be arranged alphabetically and then chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations](#) (LTWA).

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2020. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2022. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in a book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2023. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 2023. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2023).

Reference to a dataset:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset]. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88) [software]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known.

You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)

- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word "preprint" or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support [Citation Style Language \(CSL\)](#) such as [Mendeley Reference Manager](#).

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to [remove all field codes](#) before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

Submitting your manuscript

Submission checklist

Before completing the submission of your manuscript, we advise you to read our submission checklist:

- One author has been designated as the corresponding author and their full contact details (email address, full postal address and phone numbers) have been provided.
- All files have been uploaded, including keywords, figure captions and tables (including a title, description and footnotes) included.
- Spelling and grammar checks have been carried out.
- All references in the article text are cited in the reference list and vice versa.

- Permission has been obtained for the use of any copyrighted material from other sources, including the Web.
- For gold open access articles, all authors understand that they are responsible for payment of the article publishing charge (APC) if the manuscript is accepted. Payment of the APC may be covered by the corresponding author's institution, or the research funder.

After receiving a final decision

Article Transfer Service

If your manuscript is more suitable for an alternative Elsevier journal, you may receive an email asking you to consider transferring your manuscript via the [Elsevier Article Transfer Service](#).

The recommendation could come from the journal editor, a dedicated [in-house scientific managing editor](#), a tool-assisted recommendation or a combination.

If you agree with the recommendation, your manuscript will be transferred and independently reviewed by the editors of the new journal. You will have the opportunity to make revisions, if necessary, before the submission is complete at the destination journal.

Publishing agreement

Authors will be asked to complete a publishing agreement after acceptance. The corresponding author will receive a link to the online agreement by email. We advise you to read [Elsevier's policies related to copyright](#) to learn more about our copyright policies and your, and your employer's/institution's, additional rights for subscription and gold open access articles.

License options

Authors will be offered [open access user license options](#) which will determine how you, and third parties, can reuse your gold open access article. We advise that you review these options and any funding body license requirements before selecting a license option.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Permission for copyrighted works

If excerpts from other copyrighted works are included in your article, you must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) within your article using [Elsevier's permission request and license form](#) (Word).

Proof correction

To ensure a fast publication process we will ask you to provide proof corrections within two days.

Corresponding authors will be sent an email which includes a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to Word. You can edit text, comment on figures and tables and answer questions raised by our copy editor. Our web-based proofing service ensures a faster and less error-prone process.

You can choose to annotate and upload your edits on the PDF version of your article, if preferred. We will provide you with proofing instructions and available alternative proofing methods in our email.

The purpose of the proof is to check the typesetting, editing, completeness and correctness of your article text, tables and figures. Significant changes to your article at the proofing stage will only be considered with approval of the journal editor.

Share Link

A customized [Share Link](#), providing 50 days free access to the final published version of your article on [ScienceDirect](#), will be sent by email to the corresponding author. The Share Link can be used to share your article on any communication channel, such as by email or on social media.

For an extra charge, you will be provided with the option to order paper offprints. A link to an offprint order form will be sent by email when your article is accepted for publication.

A Share Link will not be provided if your article is published gold open access. The final published version of your gold open access article will be openly available on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Responsible sharing

We encourage you to share and promote your article to give additional visibility to your work, enabling your paper to contribute to scientific progress and foster the exchange of scientific developments within your field. Read more about how to [responsibly share and promote your article](#).

Resources for authors

Elsevier Researcher Academy

If you would like help to improve your submission or navigate the publication process, support is available via [Elsevier Researcher Academy](#).

Elsevier Researcher Academy offers free e-learning modules, webinars, downloadable guides and research writing and peer review process resources.

Language and editing services

We recommend that you write in American or British English but not a combination of both.

If you feel the English language in your manuscript requires editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English, you may wish to use the [English Language Editing service](#) provided by Elsevier's Author Services.

Getting help and support

Author support

We recommend that you visit our [Journal Article Publishing Support Center](#) if you have questions about the editorial process or require technical support for your submission. Some popular FAQs:

- [How can I track the status of my submitted article?](#)
- [When will my article be published?](#)



Todo o conteúdo deste site: Copyright © 2025 Elsevier B.V., seus licenciadores e colaboradores. Todos os direitos são reservados, incluindo aqueles para mineração de texto e dados, treinamento de IA e tecnologias semelhantes. Para todo o conteúdo de acesso aberto, aplicam-se os termos de licenciamento relevantes.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação fenotípica e molecular da suscetibilidade a fármacos em isolados clínicos de *Leishmania ssp*

Pesquisador: Mayara Ingrid Sousa Lima

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 3

CAAE: 24685019.8.0000.5087

Instituição Proponente: Universidade Federal do Maranhão

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.921.086

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada de ocorrência mundial, causada por parasitas do gênero da *Leishmania*, sendo endêmica em vários países incluindo o Brasil. A quimioterapia da doença limita-se apenas a algumas alternativas viáveis, sendo os antimoniais e a anfotericina B as drogas mais utilizadas no tratamento dos pacientes, porém, o surgimento de falhas terapêuticas e recidivas clínicas tornaram-se grandes desafios na terapêutica da doença. A ocorrência desses fenômenos deve-se principalmente à variabilidade do parasito na susceptibilidade da doença. De acordo com a literatura, existem relatos de baixas dosagens e tratamentos descontínuos usando os fármacos tradicionais, levando assim, a falhas terapêuticas pela seleção de formas resistentes da *Leishmania*, tornando assim umas grandes desvantagens no tratamento da doença. Esses fenômenos envolvem inúmeros aspectos, como a relação do hospedeiro, a droga e também ao parasita. Em nosso país, os dados relacionados a falha terapêutica no tratamento usando os fármacos tradicionais ainda são tímidos, apesar do grande número de relatos clínicos de pacientes não responsivos nos últimos anos. No estado do Maranhão, estes relatos tem sido mais frequentes, sendo estimado 36% de recidiva em pacientes com Leishmaniose Visceral nesta região, reafirmando a urgência clínica e a necessidade de investigação nesses casos. Deste modo, objetiva-se avaliar a susceptibilidade de isolados clínicos de *Leishmania spp.* obtidos de pacientes

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 3.921.086

do Maranhão. Também, será avaliada a expressão diferencial de genes, reconhecidamente relacionados com mecanismos de resistência em *Leishmania* spp, por PCR em Tempo Real. Assim, os dados gerados nesse projeto irão confirmar o nível de susceptibilidade desses isolados clínicos e contribuir para um melhor entendimento desses casos onde ocorre falha terapêutica, além de possibilitar a investigação dos possíveis mecanismos de resistência do parasito.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar a caracterização biológica de isolados clínicos de *Leishmania* spp. provenientes de pacientes com leishmaniose tegumentar e visceral do estado do Maranhão.

Objetivo Secundário:

Registrar os locais de origem dos pacientes com leishmanioses do estado do Maranhão, afim de conhecer as principais linhagens circulantes de *Leishmania* spp. do estado; Identificar as espécies de *Leishmania* spp. dos isolados clínicos obtidos no estudo; Verificar a suscetibilidade contra o antimônio trivalente e a anfotericina B em formas promastigotas dos isolados clínicos; Verificar a suscetibilidade contra o antimônio pentavalente (Glucantime®) e a anfotericina B em formas amastigotas intracelulares dos isolados clínicos; Determinar o potencial de infecção dos isolados clínicos em macrófagos RAW; Avaliar o nível de mRNA de genes correlacionados a sensibilidade e resistência ao antimônio e a anfotericina B nos isolados clínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos parcialmente são existentes apenas no exame resultante do mielograma, por sua coleta possui variantes de acordo com o local escolhido contudo, podem ocorrer complicações relacionadas à anestesia e à coleta propriamente dita, como dor local, que é facilmente controlada com uso de analgésicos comuns. No caso da biópsia não precisa de uma anestesia geral, apenas anestesia local por se tratar de fragmentos de lesões na pele do paciente, mas com dores localizadas que também pode ser facilmente controlada com uso de analgésicos comuns. Este procedimento será feito por meio de procedimentos ambulatoriais rotineiros acompanhados por um médico devidamente treinado.

Benefícios:

Os resultados obtidos fornecerão dados para serem investigados em outras linhagens e isolados clínicos obtidos de outras áreas endêmicas para as leishmanioses. Esses dados contribuirão para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência no parasito e também pode subsidiar as decisões das equipes médicas quanto à escolha correta do esquema terapêutico. Esse projeto vai

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 3.921.086

contribuir também com as pesquisas em resistência medicamentosa, especialmente na Leishmaniose considerada uma doença negligenciada no Brasil, particularmente no Maranhão. Isso traz fortes impactos para população, uma vez que é crescente o número de indivíduos acometidos com a doença, mas que não obtém sucesso com o uso dos fármacos tradicionais. Nesse sentido, conseguir identificar de forma precoce as cepas presentes nos indivíduos que são resistentes pode evitar um tratamento desnecessário e o desenvolvimento de reações adversas desvantajosas. Além do que, evita gastos adicionais pelo Sistema Único de Saúde com medicamentos que não são eficientes em determinados indivíduos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa esta bem elaborada e com todos os elementos necessários ao seu pleno desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórios foram entregues e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Não existem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1453554.pdf	04/03/2020 15:25:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	1111ProjetoLeishmanioseversaatualizada.pdf	11/11/2019 16:21:02	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Cartaacomitedeetica.pdf	11/11/2019 16:19:43	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito
Outros	Declaracao_para_inicio_da_pesquisa.pdf	23/10/2019 12:44:25	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_mielograma.pdf	23/10/2019 12:39:26	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética

CEP: 65.080-040

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3272-8708

Fax: (98)3272-8708

E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 3.921.086

Justificativa de Ausência	TCLE_mielograma.pdf	23/10/2019 12:39:26	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biopsia.pdf	23/10/2019 12:39:03	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Projeto_Leishmaniose.pdf	23/10/2019 12:05:25	Mayara Ingrid Sousa Lima	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 17 de Março de 2020

Assinado por:
FRANCISCO NAVARRO
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

C E R T I F I C A D O (12/2022)

Certificamos que a proposta intitulada: “**Avaliação da susceptibilidade à fármacos em isolados clínicos de Leishmania spp. obtidos em uma área endêmica de leishmanioses**” **Processo 23115.006029/2022-27**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 30 de março de 2022.

We certify that the proposal: “**Drug susceptibility evaluation in clinical isolates of Leishmania spp. obtained in leishmaniasis endemic area**”, **Process 23115.006029/2022-27**, under the responsibility of **Prof. Dr. Mayara Ingrid Sousa Lima**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of March 30, 2022.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências Biológicas

Vigência: 01/05/2022 a 31/12/2024

ANIMAIS

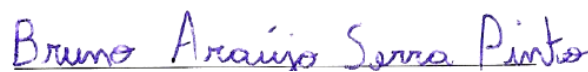
Origem: Biotério Central da UFMA e Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP

Espécie: *Mus musculus* **Sexo:** Fêmeas **Idade:** 5-10 semanas
var Swiss e **Peso:** 30g
Balb/c

AMOSTRA
50

Local do experimento: Sala de Experimentação do LabGeM da UFMA.

São Luís, 31 de março de 2022


Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Documento assinado digitalmente
gov.br Bruno Araújo Serra Pinto
Data: 31/03/2022 14:57:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>