

Identificação de genes de *Leishmania amazonensis* associados à resistência à miltefosina.

Palavras-Chave: *Leishmania amazonensis*, miltefosina, resistência a drogas

Autores(as):

Ticiane Rodrigues dos Santos, IB – UNICAMP

Dra. Elizabeth Magiolo Coser, IB – UNICAMP

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho, IB- UNICAMP

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidas por flebotomíneos. Em seu ciclo de vida, esse parasito apresenta duas formas: promastigota (alongada e com flagelo aparente) e amastigota (intracelular, arredondada e sem flagelo aparente) (Podinovskaia and Descoteaux 2015).

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: tegumentar e visceral. A forma tegumentar apresenta-se quatro formas distintas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LD) (Silveira 2019). A manifestação clínica depende da espécie do protozoário e da resposta imunológica do hospedeiro humano. No Brasil há 8 espécies de *Leishmania* que afetam seres humanos, sendo elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansoni*, *L. (V.) shawii*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*; que causam leishmaniose tegumentar e *L. (L.) infantum* que causa leishmaniose visceral (Akhoundi, Kuhls et al. 2016).

Atualmente, os tratamentos para leishmaniose são limitados, possuindo apenas três opções de fármacos aprovados no Brasil: os antimoniais pentavalente, a anfotericina B e a pentamidina. Esses fármacos são de alto custo e administrados por via parenteral. Recentemente, foi aprovado no Brasil o uso de miltefosina para o tratamento de leishmaniose tegumentar, sendo este, o primeiro fármaco de administração oral para o tratamento de leishmanioses.

A miltefosina é um análogo de fosfatidilcolina desenvolvido inicialmente como um antitumoral, e apresentou eficácia de 90% para leishmaniose visceral em um estudo realizado na Índia e no Sudeste Asiático (Jha, Sundar et al. 1999). No Brasil, dois estudos clínicos apresentaram eficácia de 70% para leishmaniose tegumentar, ambos com resultado superior à eficácia do antimonial pentavalente, medicamento de primeira escolha para o tratamento da doença no Brasil (Machado, Ampuero et al. 2010). A resistência aos fármacos disponíveis consiste um importante problema de saúde pública para uma série de doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses que possuem um número limitado de fármacos disponíveis e taxas significativas de falha no tratamento (Fairlamb, Gow et al. 2016).

Recentemente o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho sequenciou o genoma de uma linhagem de *L. (L.) amazonensis* resistente à miltefosina (MF150.3), cultivada e selecionada *in vitro* através do aumento gradativo da concentração do fármaco (Coelho, Trinconi et al. 2014). A partir do sequenciamento do genoma completo desta linhagem resistente, no presente trabalho, foi proposto identificar as mutações específicas na linhagem MF150.3 associadas ao fenótipo de resistência à miltefosina.

METODOLOGIA

Análise bioinformática do genoma de MF150.3

O genoma da linhagem MF150.3 foi previamente sequenciado por um Illumina HiSeq2500. As bibliotecas foram geradas a partir de DNA genômico total purificado, utilizando o TruSeq Nano DNA kit, conforme as instruções do fabricante. As bibliotecas de DNA foram sequenciadas utilizando fragmentos *paired-end* com *reads* de 2x150 pb, Um total de 22.054.382 *reads* foram gerados, dos quais 98,1% foram mapeados no genoma referência da cepa de *L. (L.) amazonensis* M2269, apresentando uma cobertura de 91X, considerando que o genoma desta espécie possui cerca de 32 Mb (Downing, Imamura et al. 2011). Para as análises de bioinformática, as sequências da linhagem MF150.3 foram alinhadas com o genoma referência de *L. (L.) amazonensis* (Aslett, Aurrecochea et al. 2010), utilizando o software Burrows-Wheeler Aligner (Li and Durbin 2009); os polimorfismos/mutações foram determinados utilizando o software SAMtools (Li, Handsaker et al. 2009).

Cultivo e extração de DNA genômico da linhagem MF150.3

Promastigotas da linhagem resistente de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio 199 estéril (Sigma-Aldrich) e complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa a 25°C e os repiques foram realizados semanalmente. Para a extração do DNA genômico, foram utilizados cerca de 10 mL de cultura, contendo pelo menos 1×10^8 parasitos. A cultura foi centrifugada, o sobrenadante removido e os parasitos lavados com solução de PBS. Foi adicionado então 1 mL de DNAzol para lisar os parasitos e depois acrescentado 1 mL de etanol 99%, homogeneizando por inversão. Em seguida, o DNA genômico foi recuperado, utilizando uma alça de fio de plástico. O DNA genômico foi lavado 2 vezes com etanol 70%, mergulhando a alça que contém o DNA genômico em um microtubo. A seguir, o DNA foi seco a temperatura ambiente, sendo então solubilizado em água Milli-Q, quantificado e armazenado a 4°C.

Amplificação dos polimorfismos por PCR

Os iniciadores dirigidos para as mutações identificadas nos respectivos genes foram desenhados utilizando o software Primer3 (Untergasser, Cutcutache et al. 2012). Para as reações de PCR, foram utilizadas as enzimas *Taq Polimerase Recombinante (Invitrogen)* e *Phusion High-Fidelity (New England Biolabs)*. As reações foram realizadas conforme as instruções de cada fabricante. O resultado de cada amplificação foi analisado em uma eletroforese em gel de agarose 1%. Após confirmada, o DNA amplificado foi purificado utilizando o kit *PureLink Quick PCR Purification Kit (Invitrogen)*, quantificado e armazenado até o sequenciamento.

Confirmação das mutações por Sequenciamento Sanger

A sequência de nucleotídeos de cada região amplificada foi determinada por sequenciamento Sanger. As amostras foram realizadas em um ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) disponível no LaCTAD (UNICAMP). Para as reações de sequenciamento foram utilizados os terminadores fluorescentes do Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Os resultados do sequenciamento foram analisados utilizando os softwares Lasergene (DNASTAR) e Clone Manager 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de bioinformática do genoma da linhagem resistente MF150.3

Para a detecção de variantes de único nucleotídeo (SNVs), como inserções/deleções (InDels) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), as leituras do sequenciamento Illumina da linhagem MF150.3 foram analisadas nos programas FreeBayes v.1.1.0 e SnpEff v.4.3t para a anotação dessas variantes. Foram obtidas um total de 413 variantes (368 SNPs e 45 InDels) na linhagem MF150.3. Uma vez que muitas dessas variantes também foram identificadas no genoma de isolados e linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis* a outros fármacos previamente sequenciados pelo nosso grupo, priorizamos as variantes que eram específicas da linhagem MF150.3. A partir desta análise, selecionamos 6 potenciais mutações (SNPs), incluindo a mutação no gene do transportador de miltefosina (Tabela 1), previamente identificado e envolvido na resistência à miltefosina (Coelho, Trinconi et al. 2014). Foram encontradas também mutações nesse gene em linhagens resistentes à miltefosina de *L. (L.) infantum*

(Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Portanto, as mutações identificadas na linhagem MF150.3 estão localizadas nos cromossomos 06, 13, 14, 24, 27 e 34 (Tabela 1).

Tabela 1. Mutações identificadas na linhagem MF150.3 quando comparadas com a linhagem parental M2269 de *L. (L.) amazonensis* através de análise de bioinformática.

Cromossomo	Gene ID	Gene	Tamanho do gene (pb)	Posição da mutação no gene	Base M2269	Base MF150.3	Aminoácido mutado
06	LAMA_060012000	Lanosterol sintase	3.009	898	A	G	K por E
13	LAMA_130020800	ATPase transportadora de fosfolipídios (MT)	3.315	2.555	C	T	G por E
14	LAMA_140013600	Elongase de ácidos graxos	1.137	276	G	C	W por C
24	LAMA_240013500	Inositol polifosfatase	8.232	2206	C	A	L por I
27	LAMA_270030200	Acil-CoA oxidase	2.160	1832	G	A	A por V
34	LAMA_340010500	Fosfatidilinositol-4-Fosfatase 5-quinase	3.261	2131	C	T	P por S

Validação das mutações identificadas através do sequenciamento Sanger

Foram desenhados iniciadores para 5 dos genes descritos na Tabela 1, com exceção do gene que codifica a ATPase transportadora de fosfolipídios ou transportador de miltefosina (MT) (gene *LAMA_130020800*), cuja mutação já havia sido confirmada previamente (Coelho, Trinconi et al. 2014).

O gene que codifica a elongase de ácidos graxos foi o primeiro a ser analisado, uma vez que uma mutação neste gene foi previamente descrita em uma linhagem de *L. (L.) infantum* resistente à miltefosina (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Todavia, esse gene em *L. (L.) amazonensis* apresenta 16 cópias por isso, para amplificá-lo foram desenhados dois pares de iniciadores, um dirigido a fase de leitura aberta e o outro par dirigido para a região intergênica não traduzida. Os iniciadores específicos para cada gene estão indicados na Figura 1.

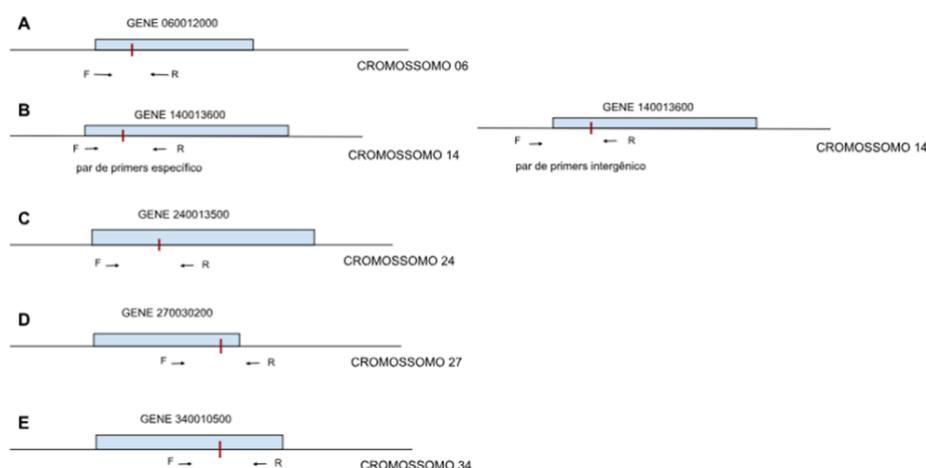


Figura 1. Representação esquemática dos iniciadores de cada um dos genes analisados. (A) Lanosterol sintase; (B) Elongase de ácidos graxos; (C) inositol polifosfatase; (D) Acyl- CoA Oxidase; (E) Fosfatidilinositol-4-Fosfatase 5-quinase. A linha vermelha representa a posição da mutação em cada um dos genes.

O resultado da PCR do gene que codifica a elongase de ácidos graxos (*LAMA_140013600*) está mostrado na

Figura 2.

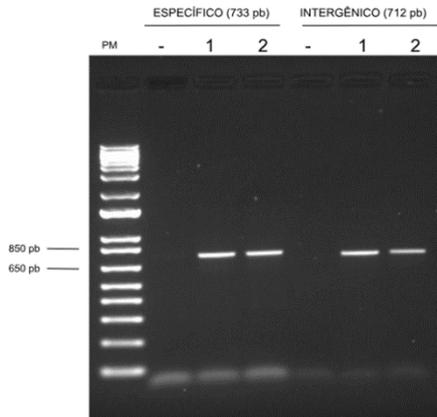


Figura 2. Amplificação por PCR do gene *LAMA_140013600*, utilizando dois pares de iniciadores que amplificam fragmentos de 733 e 712 pb (Fig. 1). Legenda: (-) controle negativo, PCR na ausência de DNA genômico; (1) PCR com DNA genômico da cepa M2269; (2) PCR com DNA genômico da linhagem MF150.3; (PM) peso molecular *Ladder 1kb*; (pb) pares de base.

A seguir, os produtos dos demais genes foram amplificados por PCR (Figura 3), para posterior etapa de sequenciamento e confirmação das respectivas mutações nos genes da linhagem MF150.3.

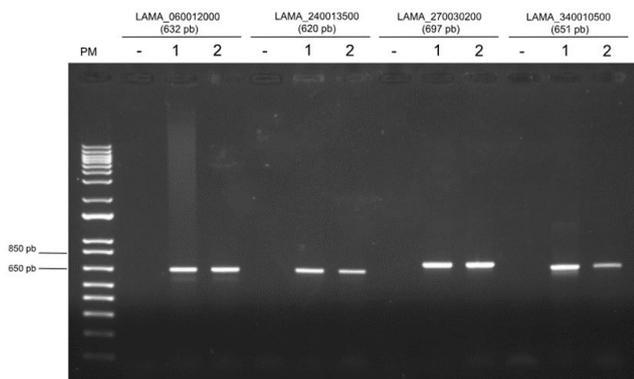


Figura 3. Amplificação por PCR dos genes *LAMA_060012000*, *LAMA_240013500*, *LAMA_270030200* e *LAMA_340010500* que amplificam produtos de 632, 620, 697 e 651 pb respectivamente. Legenda: (-) controle negativo, PCR na ausência de DNA genômico; (1) PCR com DNA genômico da cepa M2269; (2) PCR com DNA genômico da linhagem MF150.3; (PM) peso molecular *Ladder 1kb*; (pb) pares de base.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados os terminadores fluorescentes do *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)* conforme as instruções do fabricante. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando o *software Lasergene (DNASTAR)*. A análise do sequenciamento dos respectivos genes, *LAMA_060012000*, *LAMA_140013600*, *LAMA_240013500* e *LAMA_340010500*, confirmou a presença das respectivas mutações, todas elas heterozigóticas, conforme demonstrado na Figura 4.

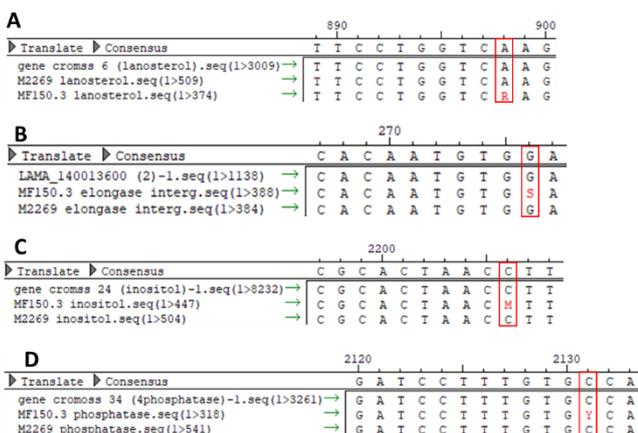


Figura 4. Resultado do sequenciamento dos genes *LAMA_060012000* (A); *LAMA_140013600* (B); *LAMA_240013500* (C); *LAMA_340010500* (D).

Apenas o gene *LAMA_270030200* (Acyl- CoA oxidase) não foi possível confirmar a mutação, até a submissão deste resumo. Todavia, um novo par de iniciadores já havia sido sintetizado para posterior amplificação por PCR e sequenciamento.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho de pesquisa foi possível confirmar, até o presente momento, as mutações dos genes Lanosterol sintase (*LAMA_060012000*); Elongase de ácidos graxos (*LAMA_140013600*); Inositol polifosfatase (*LAMA_240013500*) e Fosfatidilinositol-4-Fosfatase 5-quinase (*LAMA_340010500*) cujos produtos gênicos podem estar relacionados com o fenótipo de resistência à miltefosina da linhagem MF150.3.

BIBLIOGRAFIA

- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay and D. Sereno (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(3): e0004349.
- Aslett, M., C. Aurrecochea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, M. J. Gardner, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, C. Hertz-Fowler, R. Houston, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, F. J. Logan, J. A. Miller, S. Mitra, P. J. Myler, V. Nayak, C. Pennington, I. Phan, D. F. Pinney, G. Ramasamy, M. B. Rogers, D. S. Roos, C. Ross, D. Sivam, D. F. Smith, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, Jr., S. Subramanian, R. Thibodeau, A. Tivey, C. Treatman, G. Velarde and H. Wang (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D457-462.
- Bhattacharya, A., P. Leprohon, S. Bigot, P. K. Padmanabhan, A. Mukherjee, G. Roy, H. Gingras, A. Mestdagh, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2019). "Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in Leishmania." *Nat Commun* **10**(1): 5627.
- Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa and S. R. Uliana (2014). "In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a Leishmania amazonensis isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(7): e2999.
- Downing, T., H. Imamura, S. Decuyper, T. G. Clark, G. H. Coombs, J. A. Cotton, J. D. Hilley, S. de Doncker, I. Maes, J. C. Mottram, M. A. Quail, S. Rijal, M. Sanders, G. Schonian, O. Stark, S. Sundar, M. Vanaerschot, C. Hertz-Fowler, J. C. Dujardin and M. Berriman (2011). "Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance." *Genome Res* **21**(12): 2143-2156.
- Fairlamb, A. H., N. A. Gow, K. R. Matthews and A. P. Waters (2016). "Drug resistance in eukaryotic microorganisms." *Nat Microbiol* **1**(7): 16092.
- Jha, T. K., S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss and J. Berman (1999). "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." *N Engl J Med* **341**(24): 1795-1800.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." *Bioinformatics* **25**(14): 1754-1760.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis and R. Durbin (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* **25**(16): 2078-2079.
- Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimarães, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna and E. M. Carvalho (2010). "Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(12): e912.
- Podinovskaia, M. and A. Descoteaux (2015). "Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction." *Future Microbiol* **10**(1): 111-129.
- Silveira, F. T. (2019). "What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **113**(9): 505-516.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* **40**(15): e115.