



O USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PODE SER UM MEIO DE TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE

VITOR PEGORER BILHARINHO; ISABEL RODRIGUES ROSADO; JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR; ROGÉRIA SERAKIDES; ENDRIGO GABELLINI LEONEL ALVES

RESUMO

A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas de maior importância médica e veterinária e é um problema de saúde pública em vários países. De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde, 94% dos novos casos ocorreram em sete países entre eles o Brasil, que conta com muitas áreas endêmicas. Esses países compartilham problemas como epidemias frequentes, seres humanos e animais atuando como reservatórios e a presença de moscas transmissoras. Recentemente, foi demonstrado que as células-tronco funcionam como um nicho protetor para patógenos contra a ação do sistema imunológico e contra a ação de medicamentos. O objetivo deste relato de caso é registrar o achado de parasitas causadores de leishmaniose em células-tronco mesenquimais de cães de uma área não endêmica, que foram negativas quando submetidas aos testes de imunofluorescência indireta e ELISA, que até o momento são o protocolo indicado pelo MAPA, fato que não havia sido documentado até o momento. Isso demonstra que essa zoonose letal e amplamente distribuída pode escapar dos meios tradicionais de diagnóstico e que a terapia com células-tronco, que vem ganhando enorme popularidade como novo tratamento revolucionário para diversas doenças, tem o potencial de ser uma fonte de transmissão da doença. Este achado abre margem para que se questione a relativa segurança presumida da terapia com células-tronco, demonstrando a necessidade da avaliação criteriosa dos possíveis riscos associados ao seu uso, especialmente o risco de transmissão de parasitas não pode ser ignorado. Portanto, é essencial desenvolver protocolos rigorosos de triagem e testes para garantir a segurança da terapia com células-tronco.

Palavras-chave: Zoonose; Saúde pública; Leishmaniose visceral; Terapia celular; Área endêmica.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas de maior importância médica e veterinária e é um problema de saúde pública em vários países (ALVAR,2012; STERVERDING,2017). De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde, 94% dos novos casos ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Esses países compartilham problemas como epidemias frequentes, seres humanos e animais atuando como reservatórios e a presença de moscas transmissoras (WHO,2022).

A doença é transmitida pela picada de artrópodes voadores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Ela pode se manifestar na forma cutânea ou visceral, dependendo do tipo de célula

infectada e, se não for tratada, a taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento pode chegar a 100% em dois anos (STERVERDING, 2017; WHO, 2022).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes que podem ser isoladas de diferentes tecidos, como medula óssea (ALVES, 2014), cordão umbilical, tecido adiposo (ALVES, 2016), sangue periférico, raiz de dente e fígado (ELAHI, 2016). A terapia com células-tronco surgiu como uma abordagem promissora para o tratamento de uma ampla gama de doenças e lesões (CAMARA, 2021; ROSADO, 2017). As células-tronco têm a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células e podem ser usadas para substituir ou reparar tecidos danificados (ALVES, 2017). No entanto, a segurança da terapia com células-tronco tem sido uma grande preocupação devido aos possíveis riscos associados ao seu uso, inclusive a possibilidade de introdução de parasitas no hospedeiro (KÖRBLING, 2003).

Recentemente, foi demonstrado que as células-tronco funcionam como um nicho protetor para patógenos, como o *Mycobacterium tuberculosis* (DAS, 2013). Estudos sugerem que essas células protegem os patógenos intracelulares da ação do sistema imunológico e da ação de medicamentos, uma vez que residem em locais imunoprivilegiados na medula óssea e as células-tronco mesenquimais não desencadeiam funções efetoras de linfócitos T citotóxicos, pois não possuem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II e suas moléculas MHC I são funcionalmente inativas (FUJISAKI, 2011; RASMUSSEN, 2007; TORMIN, 2011).

O gênero *Leishmania* desenvolveu mecanismos de sobrevivência, como a modulação das atividades dos fagolisossomos de macrófagos (HANDMAN, 2002), neutrófilos, aumentando sua vida útil nos tecidos e retardando sua apoptose, beneficiando assim a multiplicação do parasita, e até mesmo o mecanismo conhecido como "cavalo de troia" (REGLI, 2017). Estudos in vitro relataram a infecção de células-tronco mesenquimais por diferentes espécies de *Leishmania*, o que pode sugerir um mecanismo usado pela *Leishmania* para burlar o sistema imunológico, apresentar pacientes assintomáticos e reativar a doença (ALLAHVERDIYEV, 2011).

Estudos demonstraram que os parasitas *Leishmania* são capazes de infectar células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e alterar seu potencial de diferenciação, levando ao desenvolvimento de um microambiente imunossupressor que apoia a sobrevivência do parasita (FAVALI, 2007; MARKIKOU-OUNI, 2015). Outro estudo relatou a presença de parasitas *Leishmania* em MSCs derivadas do cordão umbilical, sugerindo que os parasitas podem estar presentes na própria preparação das células-tronco (DIRKX, 2022).

O principal objetivo deste relato de caso é documentar o isolamento acidental e sem precedentes de formas amastigotas de *Leishmania* em culturas de células-tronco mesenquimais de cães de uma região não endêmica para a doença. Vale ressaltar que este é o primeiro relato desse tipo no mundo, e seu objetivo é aumentar a conscientização sobre a necessidade de estabelecer critérios rigorosos de seleção e triagem para doadores de células-tronco.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Três cães machos saudáveis, sem raça definida, com dois anos de idade e massa corporal média de 18 ± 2 kg, foram recebidos no Centro de Experimentação de Pequenos Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram submetidos a exame clínico e amostras de sangue foram coletadas para hemograma e sorologia para diagnóstico de leishmaniose pelos métodos ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e RIFI (Indirect Immunofluorescence). Não foram observadas alterações nos exames clínicos ou no hemograma, e os resultados do ELISA e da RIFI foram negativos para os três animais. Na semana seguinte, os cães foram submetidos à biópsia do tecido adiposo para isolar e cultivar células-tronco mesenquimais. A região glútea direita foi tricotomizada e preparada para a cirurgia asséptica. A veia cefálica foi cateterizada e os animais receberam propofol (Fresofol, Fresenius Kabi, Brasil) 3mg/kg, intravenoso (IV) para intubação e manutenção

anestésica. Como analgésico e anti-inflamatório, foi administrado meloxicam (Maxicam, Ouro Fino, Brasil) 0,2mg/kg, intramuscular (IM), imediatamente após a indução da anestesia.

As amostras de tecido adiposo foram retiradas cirurgicamente da região glútea subcutânea logo acima do trocânter maior. Aproximadamente 1 cm³ de tecido adiposo foi retirado de cada animal, totalizando 3 cm³ de amostra final. Imediatamente após a coleta, as amostras de tecido adiposo foram enviadas ao Centro de Células-Tronco da Escola de Veterinária da UFMG para isolamento e cultivo de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) de acordo com o protocolo estabelecido e descrito abaixo (ALVES, 2017). As amostras de tecido adiposo foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,15 molar e submetidas a um protocolo de digestão usando uma solução de collagenase B (Roche Applied Science, Alemanha) a 0,1% em massa/volume (M/V). Após o processamento, a fração estromal foi cultivada em frascos T75 mantidos em estufa a 37 C° e 5% de CO₂ com DMEM (Gibco, EUA), enriquecido com gentamicina (60 µg/L), penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, anfotericina 25 µg/mL (PSA, Sigma-Aldrich, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Soral, Brasil). O meio de cultura foi trocado a cada quatro dias e, quando a confluência celular atingiu 80 a 90%, as células foram replantadas em outras garrafas T75. Na quarta passagem, as células foram submetidas à caracterização fenotípica por citometria de fluxo para avaliar a expressão de CD90, CD29, CD45 e CD34. Foi observada baixa expressão dos marcadores de células hematopoiéticas CD45 (1,54%) e CD34 (0,88%) e alta expressão dos marcadores de células-tronco CD90 (60,94%) e CD29 (77,08%). Para a avaliação morfológica, as células foram plaqueadas em uma densidade de 1x10⁴ células/cm² em placas de seis poços (Techno Plastic Products em Tra-sadingen, Alemanha) contendo lamínulas estéreis (Coverslips, Sarstedt, EUA). Após sete dias de cultura a 37 C° e 5% de CO₂, as lamínulas contendo as MSC foram fixadas com álcool 70%, coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas em microscopia óptica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inesperadamente, foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* no interior das células (Fig. 1). Todas as células foram descartadas e os três cães foram testados novamente por RIFI e ELIZA e, dessa vez, dois animais foram positivos em ambos os testes e um foi negativo. Os animais também foram positivos no exame parasitológico da medula óssea, onde foram observados cinetoblastos. Os dois cães positivos foram eutanasiados com uma overdose anestésica (tiopental sódico 100 mg/Kg IV) seguida da aplicação de cloreto de potássio (solução de cloreto de potássio 19,1% 20 ml IV).

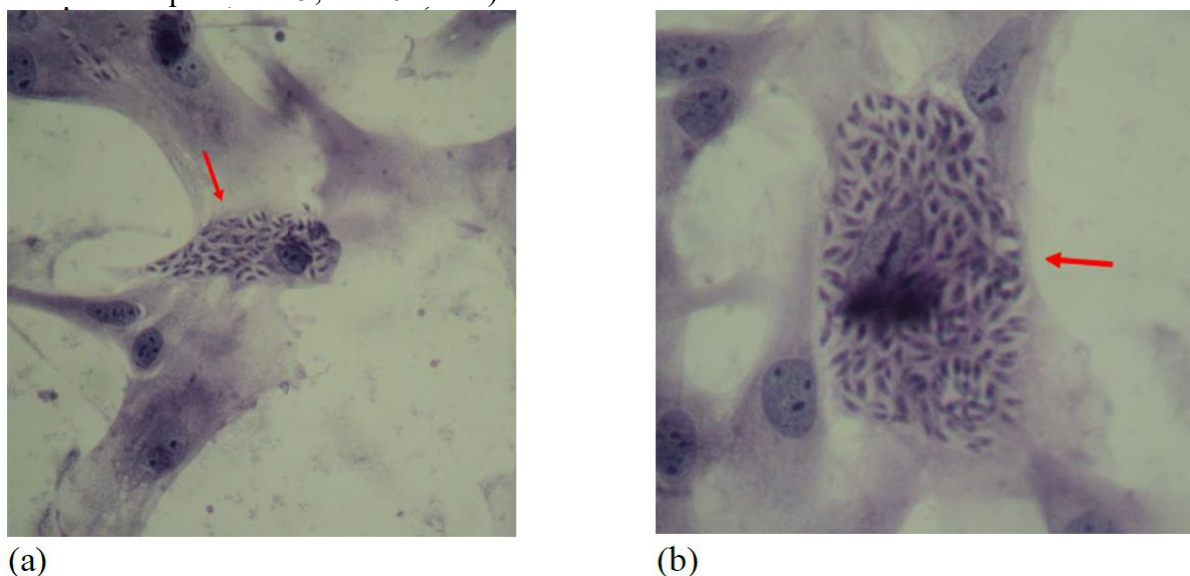


Figura 1. Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

de cães infectados com *Leishmania* spp. Observe o citoplasma das células repleto de amastigotas. Imagens "A e B" coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E), objetiva de 40x 60x. Este é o primeiro relato documentado em todo o mundo do isolamento acidental de *Leishmania* em culturas de células-tronco mesenquimais (MSC) de cães. Essa descoberta sem precedentes destaca a necessidade urgente de estabelecer padrões rigorosos na seleção de doadores de MSC. Uma vez inoculada no hospedeiro, a *Leishmania* invade qualquer célula do sistema fagocítico mononuclear (OLEKHNOVITCH, 2015). Entretanto, já foi relatado que outras células são suscetíveis à *Leishmania*, como células epiteliais amnióticas, fibroblastos (BOGDAN, 2000), hepatócitos (GANGNEUX, 2005) e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ALLAHVERDIYEV, 2011).

Os resultados deste relatório destacam as limitações dos testes laboratoriais para a detecção de leishmaniose em cães, especialmente infecções recentes. O uso de testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELI-SA), não foi eficaz na detecção de *Leishmania* nos animais deste relatório. Embora esses testes sejam recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (órgão regulador brasileiro) como testes de triagem, eles provavelmente foram realizados em um momento em que os animais ainda não haviam soroconvertido. Espera-se que, durante a leishmaniose visceral canina (LVC), os cães sintomáticos e aqueles com alto parasitismo estejam associados a um aumento nas imunoglobulinas IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE, enquanto os cães assintomáticos e aqueles com baixo parasitismo estejam associados a um aumento na IgG1 (REIS, 2009). O curso crônico da doença, o atraso na soroconversão, as reações cruzadas nos testes são todos mecanismos conhecidos que dificultam o diagnóstico e podem fazer com que a doença seja detectada várias semanas após a infecção (REIS, 2009; OLÍAS-MOLERO, 2020).

O método parasitológico é altamente específico e a identificação de apenas uma forma de amastigota é suficiente para determinar o teste como positivo. Os métodos de diagnóstico sorológico de ensaio de imunoabsorção enzimática e reação de imunofluorescência indireta são recomendados pelo MAPA, mas podem apresentar reação cruzada e não diferenciam entre infecções atuais e passadas. Mesmo assim, os cães do estudo conseguiram burlar esses métodos de diagnóstico no momento do primeiro teste. Atualmente, as técnicas baseadas em PCR são a principal abordagem diagnóstica devido à sua alta sensibilidade, além de permitir a avaliação da carga parasitária e a identificação das espécies de *Leishmania* (BRASIL, 2014).

Como alternativa para aumentar as chances de identificar um cão infectado com *Leishmania*, o MAPA destaca o uso de testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é uma técnica molecular capaz de detectar o DNA da *Leishmania* em amostras de sangue ou tecido, proporcionando maior especificidade e confirmando a infecção. Adicionalmente, a cultura de *Leishmania* de amostras de tecido, como medula óssea ou pele, também pode ser realizada para validar a presença da infecção. Biópsias de tecidos afetados, como a pele, podem ser feitas para confirmar a presença do parasita. Entretanto, há indicações de que, para uma triagem mais eficaz, existem testes que podem detectar a infecção pelo parasita mais cedo, como o ELISAp (ELISA com placas revestidas de promastigota) e, especialmente, o Western blotting (OLÍAS-MOLERO, 2020).

Um dos principais desafios da terapia com células-tronco é garantir sua segurança. Embora as células-tronco tenham demonstrado um potencial terapêutico notável em estudos pré-clínicos, seu uso em humanos continua sendo amplamente experimental. As preocupações com a segurança da terapia com células-tronco incluem o risco de tumorigênese, imunogenicidade e a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas, inclusive parasitas. Esses riscos são particularmente relevantes no contexto do transplante alogênico de células-tronco, no qual as células-tronco de um doador são usadas para tratar um paciente (GÖTHERSTRÖM, 2016).

A terapia com células-tronco está ganhando popularidade como um possível tratamento para várias condições em cães, incluindo osteoartrite, doenças autoimunes e lesões na medula espinhal (BLACK, 2007; ROSADO, 2017; RINALDI, 2014; KÖRBLING, 2003). O uso de células-tronco mesenquimais (MSCs) autólogas demonstrou ser seguro e eficaz na redução da dor e da inflamação, melhorando a mobilidade e a qualidade de vida e promovendo o reparo de tecidos em cães (BLACK, 2007). No entanto, a terapia com células-tronco tem seus riscos. Um risco em potencial é o desenvolvimento de tumores ou outros efeitos adversos resultantes do crescimento ou diferenciação descontrolados das células transplantadas (RINALDI, 2014). Outro risco é a possível transmissão de doenças infecciosas, incluindo vírus e bactérias, usando preparações de células-tronco contaminadas (ALLAHVERDIYEV, 2011).

A aplicação de anfotericina não pode ser considerada uma limitação do estudo porque, embora o medicamento tenha um efeito anti-leishmanial conhecido, a dose usada é considerada letal para apenas 50% dos parasitas *Leishmania. spp* (SOLTANI, 2019), portanto, não foi capaz de eliminar todos os parasitas da espécie nas amostras.

Apesar dos riscos, o uso de células-tronco na medicina veterinária tem se intensificado e, em alguns lugares, está até mesmo disponível para o público. Exemplos incluem o Animal Medical Center, em Nova York, EUA, que oferece terapia com células-tronco para uma variedade de doenças em cães e gatos, incluindo osteoartrite, doença do disco intervertebral e doença renal crônica; o Veterinary Specialty Hospital of the Carolinas, na Carolina do Norte, EUA, e o Veterinary Regenerative Medicine Center, em Ontário, Canadá.

Este estudo tem limitações, como a falta de identificação da espécie de *Leishmania* que foi isolada junto com as células-tronco mesenquimais, bem como a ausência de detalhes mais abrangentes sobre o parasita. Em retrospecto, é fundamental ressaltar que esse incidente ocorreu inesperadamente durante um estudo anterior. Na época, ficamos tão frustrados que todo o material foi descartado. Foi somente muitos anos depois que percebemos a importância do que tínhamos, quando não foi mais possível realizar testes adicionais para identificar detalhes mais profundos sobre o parasita.

4 CONCLUSÃO

A descoberta de formas amastigotas de *Leishmania* nesses cães de área não endêmica novamente levanta questões sobre o avanço dessa zoonose sobre o território brasileiro e sobre a suposta segurança da terapia com células-tronco. Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver protocolos padronizados para a caracterização e o controle de qualidade das células-tronco usadas na prática clínica, bem como de estabelecer diretrizes claras para a realização de estudos clínicos que avaliem a segurança e a eficácia da terapia com células-tronco. Esses esforços serão fundamentais para garantir que a terapia com células-tronco possa ser usada com segurança e eficácia para melhorar a vida de pacientes com várias doenças e lesões. Dentro do âmbito da saúde pública demonstra que pode estar havendo uma propagação silenciosa desta zoonose de difícil controle e que tem potencial para causar grande impacto socioeconômico além do estrago que causa na vida dos humanos e animais acometidos.

REFERÊNCIAS

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Host Cell in Latent Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 535–539, 1 set. 2011. ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.

ALVES, E. G. L. et al. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco

mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. suppl 1, p. 21–32, jun. 2016.

ALVES, E. G. L.; SERAKIDES, R.; ROSADO, I. R. et al. Isolation and culture of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow of dogs. **Ciência Animal Brasileira**, 18, 1-14, 2017.

BLACK, L. L. et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine**, v. 8, n. 4, p. 272–284, 2007.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 19 jun. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2014.

CAMARA, B. O. S. et al. Differentiation of canine adipose mesenchymal stem cells into insulin-producing cells: comparison of different culture medium compositions. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 74, p. 106572, 1 jan. 2021.

DAS, B. et al. CD271+ Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells May Provide a Niche for Dormant Mycobacterium tuberculosis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 170, p. 170ra13–170ra13, 30 jan. 2013.

DIRKX, L. et al. Long-term hematopoietic stem cells as a parasite niche during treatment failure in visceral leishmaniasis. **Communications biology**, v. 5, n. 1, 25 jun. 2022.

ELAHI, K. C. et al. Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

FAVALI, C. et al. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 6, p. 1401–1406, 25 jul. 2007.

FUJISAKI, J. et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 216–219, 8 jun. 2011.

GANGNEUX, J.-P. et al. In vitro and ex vivo permissivity of hepatocytes for Leishmania donovani. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 489–491, 2005.

GÖTHERSTRÖM, C. Human Foetal Mesenchymal Stem Cells. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 31, p. 82–87, 1 fev. 2016.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, ago. 2002.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair — A New Therapeutic Concept? **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 570–582, 7 ago. 2003.

MARKIKOU-OUNI, W. et al. Immunomodulatory Effects of Four *Leishmania infantum* Potentially Excreted/Secreted Proteins on Human Dendritic Cells Differentiation and Maturation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143063, 18 nov. 2015.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653–664, dez. 2015.

OLÍAS-MOLERO, A. I. et al. Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2 nov. 2020.

RASMUSSEN, I. et al. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 887–893, 3 jul. 2007.

REGLI, I. B. et al. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 16 nov. 2017.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 15 mar. 2009.

RINALDI, F.; PERLINGEIRO, R. C. R. Stem cells for skeletal muscle regeneration: therapeutic potential and roadblocks. **Translational Research**, v. 163, n. 4, p. 409–417, abr. 2014.

ROSADO, I. R. et al. Immunomodulatory and neuroprotective effect of cryopreserved allogeneic mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 1, 22 mar. 2017.

SOLTANI, S. et al. Antileishmanial activity of conventional and solid lipid nanoparticles of Amphotericin B on *Leishmania major*. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 19, 15 out. 2019.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 15 fev. 2017.

TORMIN, A. et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5067–5077, 12 maio 2011.

World Health Organization (WHO) **Global leishmaniasis surveillance, 2022: assessing trends over the past 10 years**. 2022.