

**Stricto  
ensu**  
Editora

**ATUALIDADES EM MEDICINA  
TROPICAL NO BRASIL:**

# **PROTOZOÁRIOS**



ISBN:978-65-86283-13-6

## **Organizadores**

**Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti  
Jader de Oliveira  
Luís Marcelo Aranha Camargo**

**2020**

**Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti**

**Jader de Oliveira**

**Luís Marcelo Aranha Camargo**

**(Organizadores)**

# **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**

**Rio Branco, Acre**

## Stricto Sensu Editora

**CNPJ:** 32.249.055/001-26

**Prefixo Editorial:** 80261 – 86283 / DOI: 10.35170

**Editora Geral:** Profa. Dra. Naila Fernanda Sbsczk Pereira Meneguetti

**Editor Científico:** Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

**Bibliotecária:** Tábata Nunes Tavares Bonin – CRB 11/935

**Capa:** Elaborada por Led Camargo dos Santos (ledcamargo.s@gmail.com)

**Avaliação:** Foi realizada avaliação por pares, por pareceristas *ad hoc*

**Revisão:** Realizada pelos autores e organizadores

## Conselho Editorial

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ageane Mota da Silva (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Acre)

Prof. Dr. Amilton José Freire de Queiroz (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Edson da Silva (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Jovê Cesar (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Santa Catarina)

Prof. Dr. Francisco Carlos da Silva (Centro Universitário São Lucas)

Prof. Dr. Humberto Hissashi Takeda (Universidade Federal de Rondônia)

Prof. Dr. Jader de Oliveira (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)

Prof. Dr. Leandro José Ramos (Universidade Federal do Acre – UFAC)

Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi (Universidade Federal do Acre – UFAC)

Prof. Msc. Marco Aurélio de Jesus (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariluce Paes de Souza (Universidade Federal de Rondônia)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Bernarde (Universidade Federal do Acre)

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva (Universidade Federal de Goiás)

Prof. Dr. Renato Abreu Lima (Universidade Federal do Amazonas)

Prof. Msc. Renato André Zan (Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia)

Prof. Dr. Rodrigo de Jesus Silva (Universidade Federal Rural da Amazônia)

## Ficha Catalográfica

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A886

Atualidades em medicina tropical no Brasil: protozoários /  
Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, Jader de Oliveira,  
Luís Marcelo Aranha Camargo (org.). – Rio Branco: Stricto  
Sensu, 2020.

386 p. : il.

ISBN: 978-65-86283-13-6

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136

1. Saúde. 2. Medicina tropical. 3. Protozoários. I.  
Meneguetti, Dionatas Ulises de Oliveira. II. Oliveira, Jader de. III.  
Camargo, Luis Marcelo Aranha. IV. Título.

CDD 22. ed. 614.539181

**Bibliotecária Responsável:** Tábata Nunes Tavares Bonin / CRB 11-935

O conteúdo dos capítulos do presente livro, correções e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

É permitido o download deste livro e o compartilhamento do mesmo, desde que sejam atribuídos créditos aos autores e a editora, não sendo permitido a alteração em nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.sseditora.com.br](http://www.sseditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

As Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPs), ainda são uma das principais causas de morbidade e mortalidade ocorrente no mundo. Muitas das DIPs pertencem ao grupo das Doenças Negligenciadas, estas que acometem aproximadamente 90% das pessoas com enfermidades do planeta, porém, recebem menos de 10% de todos os recursos investidos em pesquisa.

A Medicina Tropical é uma das áreas que estuda as Doenças Negligenciadas, entre elas as provocadas por protozoários, que podemos citar: Doença de Chagas, Leishmaniose, Malária, Toxoplasmose entre diversas outras que podem acometer o ser humano. Sendo assim, o presente livro nos dá a possibilidade de conhecer mais a respeito desse “Fantástico Mundo da Parasitologia”, tendo como protagonista os protozoários e as enfermidades ocasionadas pelos mesmos.

Esse livro faz parte da coletânea “Atualidades em Medicina Tropical no Brasil” que é constituído de 7 volumes, com as seguintes temáticas: Protozoários (temática deste livro), Microbiologia, Vetores, Veterinária, Epidemiologia, Educação em Saúde e Interdisciplinaridades. Toda a coletânea é “*open access*”, possibilitando assim o acesso ao conhecimento científico por todos que tiverem interesse.

Então convido os estudantes de Graduação, Pós-Graduação, Docentes, Pesquisadores e outros interessados a conhecer mais a respeito das atualidades na área da Medicina Tropical e seu impacto no Brasil, em especial neste volume as doenças ocasionadas por protozoários.

Desejo a todos uma ótima leitura!

Dionatas Meneguetti

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO. 1..... 12**

UMA BREVE SÍNTESE SOBRE O CICLO CELULAR DE PARASITOS TRIPANOSOMATÍDEOS

[Marcelo Santos da Silva \(Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.01](#)

### **CAPÍTULO. 2..... 29**

ASPECTOS CELULARES DOS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE). CAPTAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MACROMOLÉCULAS

[Miria Gomes Pereira \(Universidade Federal do Rio de Janeiro\)](#)

[Carolina de Lima Alcantara \(Universidade Federal do Rio de Janeiro\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.02](#)

### **CAPÍTULO. 3..... 48**

HISTONAS EM *Trypanosoma cruzi*: SUAS VARIANTES E MODIFICAÇÕES AO LONGO DO CICLO DE VIDA

[Juliana Nunes Rosón \(Universidade Federal de São Paulo\)](#)

[Héllida Marina Costa Silva \(Instituto Butantan\)](#)

[Júlia Pinheiro Chagas da Cunha \(Instituto Butantan\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.03](#)

### **CAPÍTULO. 4..... 68**

PROTEÍNA P21: UM NOVO ALVO PARA O TRATAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA

[Thaise Lara Teixeira \(Universidade Federal de São Paulo\)](#)

[José Franco da Silveira Filho \(Universidade Federal de São Paulo\)](#)

[Claudio Vieira da Silva \(Universidade Federal de Uberlândia\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.04](#)

**CAPÍTULO. 5..... 86**

**EFEITOS DA SINALIZAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR *Trypanosoma cruzi* NA PATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS**

Marina Ferreira Batista (Universidade Federal de Minas Gerais)

Isabela Meneghelli (Universidade Federal de Minas Gerais)

Diana Bahia (Universidade Federal de Minas Gerais)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.05

**CAPÍTULO. 6..... 104**

**MORFOFUNCIONAL E DOENÇA DE CHAGAS: REVISÃO DE LITERATURA**

Pablo Henrique Cordeiro Lessa (Universidade Federal do Amapá)

Ingrid Grace Rodrigues Barros (Universidade Federal do Amapá)

João Gabriel Barbosa Miranda (Universidade Federal do Amapá)

Ketle Figueiredo Gonçalves (Universidade Federal do Amapá)

Naara Cota de Almeida (Universidade Federal do Amapá)

Rosiana Feitosa Vieira (Universidade Federal do Amapá)

Amanda Alves Fecury (Universidade Federal do Amapá)

Cláudio Alberto Gellis de Mattos Dias (Instituto Federal do Amapá)

Ana Rízzia Cunha Cordeiro Forte (Universidade Federal do Ceará)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.06

**CAPÍTULO. 7..... 121**

**CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E O PAPEL DA IL-1 $\beta$  NA PROGRESSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS**

Camila Victória Sousa Oliveira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Hilton Antonio Mata Dos Santos (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Emiliano Horacio Medei (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Marcelo Torres Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Cláudia Neto Paiva (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.07

**CAPÍTULO. 8..... 140**

**EIXO CÁLCIO-PTH-VITAMINA D EM PACIENTES COM MALÁRIA NÃO COMPLICADA NO MUNICÍPIO DE ITAITUBA, PARÁ, BRASIL**

Janaina Maria Setto (Universidade Federal do Pará)

Rosana Maria Feio Libonati (Universidade Federal do Pará)

Ana Maria Revoredo da Silva Ventura (Universidade Estadual do Pará)

Tânia do Socorro Souza Chaves (Instituto Evandro Chagas e CESUPA)

Carina Guilhon Sequeira (Universidade Estadual do Pará)

Arnaldo Jorge Martins Filho (Instituto Evandro Chagas)

Ricardo Luiz Dantas Machado (Universidade Federal Fluminense)

Sylvia do Carmo Castro Franceschini (Universidade Federal de Viçosa)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.08

**CAPÍTULO. 9..... 162**

**COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: A EXPRESSÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi***

Gabriella Oliveira A. Moreira de Carvalho (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

Camila Moura da Silva (Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste)

Daniel Rodrigues Souza (Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste)

Thiago Manchester de Mello (Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste)

Regina Coeli dos Santos Goldenberg (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Sérgio Henrique Seabra (Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste)

Fabio da Silva de A. Fortes (Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.09

**CAPÍTULO. 10..... 179**

**TRANSMISSÃO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS: REVISÃO DA COBERTURA DO JORNALISMO DIGITAL ENTRE 2009 A 2019**

Daniela da Silva Paixão (Universidade Federal do Acre)

Luís Marcelo Aranha Camargo (Universidade de São Paulo)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (Universidade Federal do Acre)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.10

**CAPÍTULO. 11..... 196**

A DOENÇA DE CHAGAS NO CONTEXTO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

[Adriana Benatti Bilheiro \(Universidade Federal de São João del Rei\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.11](#)

**CAPÍTULO. 12..... 214**

LEISHMANIOSES COMO DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: UM PANORAMA COMPLEXO

[Anna Fernandes Silva Chagas do Nascimento \(Universidade Federal Fluminense\)](#)

[Dilvani Oliveira Santos \(Universidade Federal Fluminense\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.12](#)

**CAPÍTULO. 13..... 227**

LEISHMANIOSES NO BRASIL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DESAFIOS E PERSPECTIVAS

[Fredy Galvis-Ovallos \(Universidade de São Paulo\)](#)

[Rafaella Albuquerque e Silva \(Ministério da Saúde\)](#)

[Vanessa Gusmon da Silva \(Universidade de São Paulo\)](#)

[Priscila Basan Sabio \(Universidade de São Paulo\)](#)

[Eunice Aparecida Bianchi Galati \(Universidade de São Paulo\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.13](#)

**CAPÍTULO. 14..... 256**

LEISHMANIOSE CUTÂNEA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

[Sandra Cristina Bezerra de Almeida \(Secretaria de Educação Municipal, Rio Branco, Acre\)](#)

[Cristiane de Oliveira Cardoso \(Universidade Federal de Catalão\)](#)

[DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.14](#)

**CAPÍTULO. 15..... 271**

PANORAMA ATUAL DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL: UMA MINI-REVISÃO

[Yago Visinho dos Reis \(Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho\)](#)

Mara Cristina Pinto (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)  
Kaio Cesar Chaboli Alevi (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.15

**CAPÍTULO. 16..... 288**

**LEISHMANIOSE VISCERAL: CONTRIBUIÇÕES HISTÓRICAS E AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO PARA O CONTROLE DA DOENÇA**

Williane Fernanda Siqueira (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Mariana Santos Cardoso (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Ana Laura Grossi de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Daniella Castanheira Bartholomeu (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Lilian Lacerda Bueno (Universidade Federal de Minas Gerais)  
Ricardo Toshio Fujiwara (Universidade Federal de Minas Gerais)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.16

**CAPÍTULO. 17..... 306**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Hypnea musciformis***

Rodrigo César Fernandes Barbosa (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)  
Marcia Cristina Campos de Oliveira (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)  
Aurea Echevarria Aznar Neves Lima (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)  
Elisa Cavalcante Pereira (Instituto Oswaldo Cruz)  
Marcelo Duarte Pontes (Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro)  
Eduardo Caio Torres-Santos (Instituto Oswaldo Cruz)  
Valter Viana de Andrade-Neto (Instituto Oswaldo Cruz)  
DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.17

**CAPÍTULO. 18..... 319**

**PAPEL DE CALCINEURINAS NA INTERAÇÃO LEISHMANIA-MACRÓFAGO**

Thalita Camêlo da Silva Ferreira (Universidade de São Paulo)  
Cíntia Siess-Portugal (Universidade de São Paulo)  
Patrício Reyes Orrego (Universidad de Antofagasta)

Jorge Enrique Araya (Universidad de Antofagasta)

Mauro Cortez (Universidade de São Paulo)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.18

**CAPÍTULO. 19..... 340**

TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES: DO ABANDONO À RESISTÊNCIA - UM DESAFIO QUE PERMANECE

Anna Fernandes Silva Chagas do Nascimento (Universidade Federal Fluminense)

Dilvani Oliveira Santos (Universidade Federal Fluminense)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.19

**CAPÍTULO. 20..... 349**

TOXOPLASMOSE AGUDA ASSOCIADA A HEMOCULTURAS POSITIVAS PARA *Kocuria kristinae* EM PACIENTE IMUNOCOMPETENTE NO ESTADO DO AMAPÁ

Stephanie Pereira Leal

Ellen Paola de Araújo Castro

Rafael Darwich Coral Soares

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.20

**CAPÍTULO. 21..... 357**

TOXOPLASMOSE CONGÊNITA: ATUAÇÃO MÉDICA E FISIOTERAPÊUTICA NO MANEJO CLÍNICO DE UM RECÉM-NASCIDO PREMATURO NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL

Danilo Jun Kadosaki (Universidade do Estado do Pará)

Gabrielli Andreza Gomes Carrera (Universidade do Estado do Pará)

Elivelton Da Costa Fonseca (Universidade do Estado do Pará)

André Luiz Nunes Da Silva Carlos (Universidade do Estado do Pará)

José Lucas Dias De Souza (Centro Universitário do Estado do Pará)

Andrea Bayma Pinheiro (Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará)

André Gustavo Moura Guimarães (Universidade do Estado do Pará)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.21

**CAPÍTULO. 22..... 363**

TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE: FÁRMACOS ATUAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Erica dos Santos Martins-Duarte (Universidade Federal de Minas Gerais)

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136.22

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>ORGANIZADORES.....</b>     | <b>383</b> |
| <b>ÍNDICE REMISSIVO .....</b> | <b>384</b> |

## UMA BREVE SÍNTESE SOBRE O CICLO CELULAR DE PARASITOS TRIPANOSOMATÍDEOS

Marcelo Santos da Silva<sup>1,2</sup>

1. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Botucatu, São Paulo, Brasil;
2. Instituto Butantan, Laboratório de Ciclo Celular, São Paulo, São Paulo, Brasil.

### RESUMO

Tripanosomatídeos são um grupo de eucariotos unicelulares que englobam parasitos de grande importância médica como o *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas), *T. brucei* (agente etiológico da doença do sono) e várias espécies do gênero *Leishmania* (agentes etiológicos das diferentes formas da leishmaniose). Embora sejam eucariotos, o ciclo celular destes organismos possui diversas peculiaridades quando comparado ao ciclo celular de eucariotos modelos. Este capítulo analisa comparativamente os aspectos gerais sobre os principais eventos que ocorrem em cada fase do ciclo celular dos tripanosomatídeos (G1, S, G2, mitose e citocinese). Além disso, uma breve discussão sobre os principais mecanismos que estes organismos possuem para regular a progressão pelas fases do ciclo celular é apresentada. Vale a pena ressaltar que este capítulo conta com um apanhado geral sobre as principais novidades relativas a ciclo celular divulgadas em periódicos científicos recentes. Uma melhor compreensão sobre as peculiaridades relacionadas ao ciclo celular apresentadas por estes organismos facilitará a busca por alvos a serem explorados no desenvolvimento de terapias antiparasitárias que poderão ajudar milhões de pessoas ao redor do mundo.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. e Regulação do ciclo celular.

### ABSTRACT

Trypanosomatids are a group of single-celled eukaryotes that encompass parasites of great medical importance such as *Trypanosoma cruzi* (etiological agent of Chagas disease), *T. brucei* (etiological agent of sleeping sickness) and many species of the genus *Leishmania* (etiological agents of different forms of leishmaniasis). Although they are eukaryotes, the cell cycle of these organisms has many peculiarities relative to model eukaryotes. This chapter comparatively analyzes the general aspects of the main events that occur in each cell cycle phase of these parasites (G1, S, G2, mitosis, and cytokinesis). Also, it is presented a brief discussion about the main mechanisms that these organisms own to regulate the progression through the cell cycle phase. It is worth mentioning that this chapter has an overview of the main findings related to the cell cycle published in recent scientific journals. A better understanding of the cell cycle peculiarities presented by these

organisms may facilitate the development of antiparasitic therapies, which could help millions of people around the world.

**Keywords:** *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and Regulation of the cell cycle.

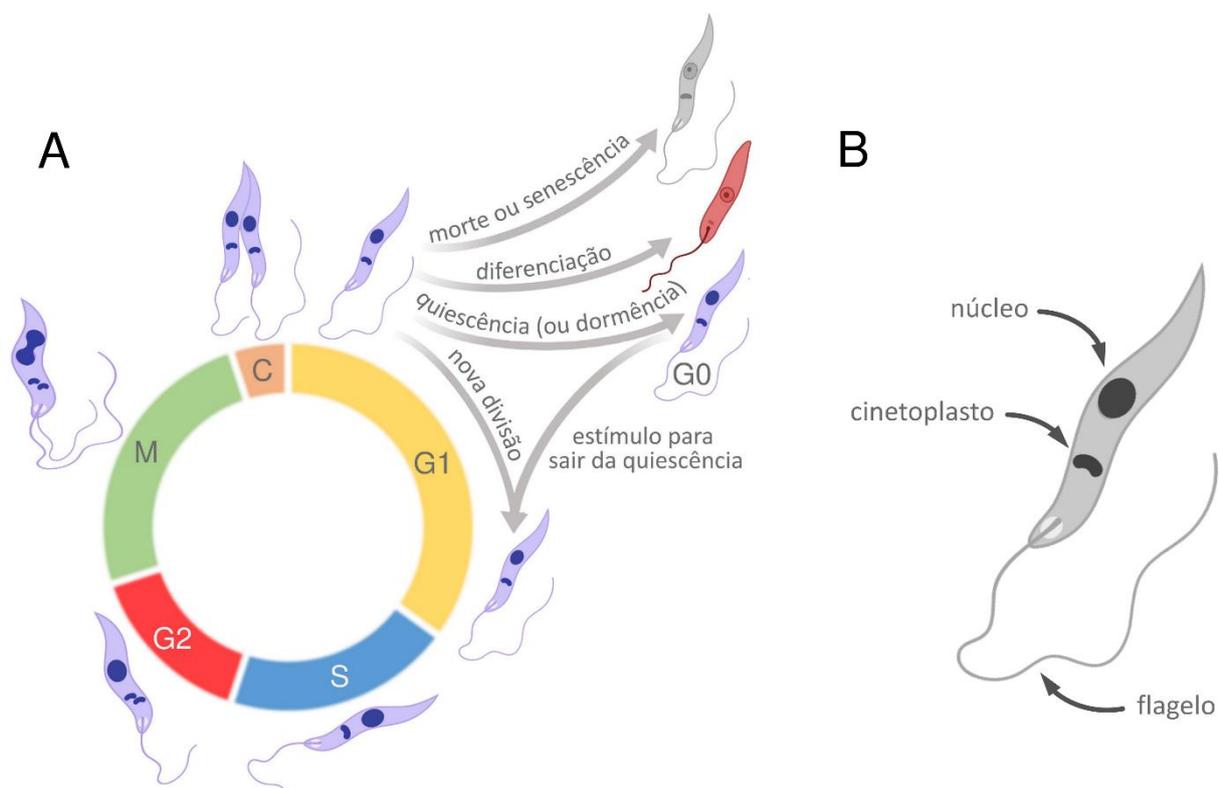
## 1. INTRODUÇÃO

Tripanosomatídeos são um grupo de protozoários (eucaritos unicelulares) que, ao contrário que muitos afirmam, não divergiram cedo na linhagem eucariótica (SIMPSON et al., 2004; OPPERDOES et al., 2016). Eles provavelmente divergiram concomitante à ocupação de um nicho que surgiu com o aparecimento dos metazoários, já que não existem tripanosomatídeos de vida livre (todos os tripanosomatídeos conhecidos, até o momento, são parasitos ou simbiontes) (DA SILVA et al., 2017a). Entre os tripanosomatídeos mais conhecidos e estudados estão patógenos humanos de grande relevância médica, como por exemplo o *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (agente etiológico da doença de Chagas), *T. brucei* Plimmer & Bradford, 1899 (agente etiológico da doença do sono) e várias espécies do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (agentes etiológicos das diferentes formas da leishmaniose). Juntos, esses parasitos infectam, aproximadamente, 20 milhões de pessoas ao redor do mundo (com mais de dois milhões de novos casos por ano), causando cerca de 50 mil mortes anualmente (LOPES et al., 2010; KHARE et al., 2016; BROWNE et al., 2017).

A maioria dos tripanosomatídeos de importância médica, como por exemplo *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp., apresentam um ciclo de vida heteroxenico, ou seja, possuem dois hospedeiros: um vertebrado (geralmente um mamífero, como por exemplo o homem) e um invertebrado (geralmente insetos) (DA SILVA; CANO, 2017). Os tripanosomatídeos assumem diferentes formas de vida de acordo com que transitam entre estes hospedeiros. Estas formas são classificadas de acordo com a morfologia do parasito em questão e podem ser divididas em formas proliferativas (replicativas) e transmissivas (não-replicativas) (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013). Neste capítulo iremos tratar apenas sobre o ciclo celular, ou seja, abordaremos apenas os aspectos gerais das formas replicativas destes organismos.

Em eucariotos de um modo geral (incluindo os tripanosomatídeos), podemos definir que o ciclo celular engloba o crescimento da célula, a replicação fidedigna do genoma e a segregação equitativa dos cromossomos entre as células filhas (LODISH et al., 2000). O

ciclo celular segue um único padrão de organização que consiste nas seguintes fases: G1 (fase de crescimento pré-replicação do DNA), S (fase de replicação do DNA), G2 (fase de crescimento pós-replicação do DNA), Mitose (fase da divisão dos cromossomos replicados) e Citocinese (fase da divisão citoplasmática efetivando a separação das duas células) (LODISH et al., 2000). Após o término do ciclo celular, existem alguns principais destinos para as células: iniciar uma nova divisão, entrar em senescência replicativa, disparar algum processo de morte celular, entrar em processo de diferenciação, ou entrar em quiescência (dormência), que também é chamada de fase G0 (Figura 1A) (LODISH et al., 2000). A fase G0 por vezes é incluída como parte do ciclo celular. Contudo, vale ressaltar que células quiescentes não estão estimuladas a entrar em divisão e, por consequência, não estão comprometidas com a replicação do genoma e divisão celular (PLANAS-SILVA; WEINBERG, 1997). Em outras palavras, células quiescentes estão fora do ciclo celular.



**Figura 1.** Esquemas ilustrando as fases do ciclo celular e a morfologia simplificada de um tripanosomatídeo hipotético na fase G1.

A. Ao final de um ciclo celular, as células-filhas resultantes podem seguir diferentes caminhos, como por exemplo entrar em morte/senescência, se diferenciar, entrar em quiescência/dormência (G0), ou entrarem novamente em divisão, passando pelas fases G1, S, G2, M (mitose) e C (citocinese). Como mencionado, a estimulação para uma célula quiescente entrar em divisão é realizada por fatores específicos. B. As setas indicam as principais estruturas de um tripanosomatídeo hipotético na fase G1: núcleo, cinetoplasto e flagelo.

Nos tripanosomatídeos, assim como nos demais eucariotos, o ciclo celular é um processo crucial para uma eficiente proliferação. Devemos entender proliferação eficiente como a garantia de uma correta duplicação e segregação de suas organelas, sobretudo o núcleo e o cinetoplasto (organela que possui o DNA mitocondrial) (Figure 1B) (DA SILVA et al., 2017b). Aqui iremos abordar os principais eventos relacionados a cada uma das fases do ciclo celular destes organismos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FASE G1 (GAP 1)

G1 é a fase em que a célula se prepara para o início da divisão celular. Para a maioria das células eucarióticas esta fase compreende o maior período de crescimento (em massa e volume) durante seu ciclo (LODISH et al., 2000). Em tripanosomatídeos, de um modo geral, G1 é a fase do ciclo celular com maior tempo de duração (DA SILVA et al., 2017b).

Nessa fase podemos destacar eventos como intensa síntese de proteínas e alta taxa de transcrição, ou seja, elevada taxa metabólica (KALUCKA et al., 2015). Cabe também destacar que durante G1 há a formação de complexos proteicos essenciais que serão utilizados durante a fase S, como, por exemplo, a formação dos complexos de pré-replicação em regiões específicas do DNA denominadas origens de replicação (DA SILVA et al., 2017a). Em eucariotos modelos, cada complexo de pré-replicação é composto pelas proteínas ORC<sub>1-6</sub>, Cdc6, MCM<sub>2-7</sub> e Cdt1. Porém, em tripanosomatídeos, a ORC (que também é um complexo proteico) é formada por subunidades completamente divergentes (DA SILVA et al., 2017a). Além disso, as proteínas Cdc6 e Cdt1 aparentemente estão ausentes no genoma destes parasitos (DA SILVA et al., 2017a).

Existem outros eventos que começam a ocorrer na fase G1 em alguns tripanosomatídeos (por exemplo *T. brucei*), como a duplicação do corpo basal (organela baseada em microtúbulos essencial para motilidade) (WOODWARD; GULL, 1990; VAUGHAN; GULL, 2016) e do complexo de Golgi (HE et al., 2004). Porém, estes eventos não se limitam a G1 e podem ser finalizados na fase seguinte (fase S) (WOODWARD; GULL, 1990; HE et al., 2004; HAMMARTON, 2007).

Outro evento importante que ocorre em G1 é a presença do ponto de checagem G1/S (do inglês *G1/S checkpoint*). Os pontos de checagem do ciclo celular são mecanismos de vigilância que monitoram a ordem, a integridade e a fidelidade dos principais eventos do ciclo celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014). Em outras palavras, trata-se de mecanismos de controle para garantir a entrada apropriada da célula na próxima fase do ciclo celular. A condição majoritária verificada no ponto de checagem G1/S é a possível presença de danos no DNA. Caso danos no DNA sejam detectados, a célula fica incapacitada de seguir para a próxima fase do ciclo celular enquanto este dano não for reparado (BARTEK; LUKAS, 2001). Vale lembrar que os tripanosomatídeos, assim como os demais eucariotos, apresentam complexos sistemas de reparo de DNA que variam de acordo com o dano presente e de acordo com a fase do ciclo em que a célula se encontra (GENOIS et al., 2014). Quando muitas células em determinada população ficam paradas para reparar possíveis irregularidades em G1, dizemos que as células estão “presas” (do inglês *arrest*) em G1. Este fenômeno pode ser facilmente visualizado através de uma análise do conteúdo de DNA utilizando citometria de fluxo (Figura 2A, B). Em tripanosomatídeos, estudos têm identificado a presença de um ponto de checagem G1/S, sendo que na maioria deles, há uma relação direta com a presença de danos no DNA (UZCANGA et al., 2017; MARIN et al., 2018).

A partir do momento que a célula não apresentar mais quaisquer anomalias, ela progride no ciclo celular, passando pela transição G1/S e se comprometendo irreversivelmente com a divisão celular.

## 2.2 FASE S (SÍNTESE DE DNA)

Nessa fase, ocorre um dos eventos mais importantes da divisão celular: a replicação (ou síntese) do DNA. Em eucariotos modelos, os complexos de pré-replicação formados anteriormente (fase G1) em regiões do DNA denominadas origens de replicação recrutam outros fatores proteicos e, após liberação de energia pela quebra de ATP, esses complexos são ativados e ocorre o que chamamos de disparos das origens de replicação (DA SILVA et al., 2017a). Esses disparos nada mais são do que a ativação, de forma bi-direcional, da replicação do DNA, que ocorre em diversos pontos do genoma através da ação de complexos proteicos chamados replissomos (DA SILVA et al., 2017a). Cada replissomo é composto fundamentalmente por um complexo helicase ativo (MCM<sub>2-7</sub>, GINS, Cdc45), DNA polimerases (DNA pol  $\alpha$ , DNA pol  $\delta$ , DNA pol  $\epsilon$ ) e outros fatores de replicação (e.g., PCNA,

DNA topoisomerasas, etc.) (ROBINSON; BELL, 2005; FRAGKOS et al., 2015; COSTER; DIFFLEY, 2017). A replicação do DNA prossegue até que os replissomos atinjam o final do cromossomo (telômeros) ou se encontrem uns com os outros.

Em tripanosomatídeos, a replicação ocorre desta mesma maneira, mas com algumas peculiaridades em relação à formação dos complexos proteicos envolvidos neste processo (DA SILVA et al., 2017a). Ainda não há um consenso sobre o número e a dinâmica de utilização das origens de replicação durante a fase S nos tripanosomatídeos, já que nem todos os complexos de pré-replicação formados nas origens durante a fase G1 são utilizados (disparados) na fase S (TIENGWE et al., 2012; DA SILVA et al., 2019). Porém, estudos recentes indicam que os cromossomos dos tripanosomatídeos são replicados a partir de múltiplas origens de replicação (TIENGWE; MARQUES; MCCULLOCH, 2014; CALDERANO et al., 2015; DA SILVA et al., 2019; DE ARAUJO; CALDERANO; ELIAS, 2019).

Normalmente, a replicação do DNA possui uma velocidade média, ou seja, há um número médio de adição de nucleotídeos por minuto que, no caso dos tripanosomatídeos, oscila na casa dos 2-3 kb.min<sup>-1</sup> [em *T. cruzi* = 2,05 kb.min<sup>-1</sup> (DE ARAUJO; CALDERANO; ELIAS, 2019), em *T. brucei* = 3.06 kb.min<sup>-1</sup> (DA SILVA et al., 2019) e em *L. major* Yakimoff & Schokhor, 1914 = 2,44 kb.min<sup>-1</sup> (STANOJCIC et al., 2016)]. O monitoramento da replicação, bem como a quantificação da velocidade de replicação, podem ser facilmente mensurados empiricamente por meio da incorporação de análogos de timidina (DA SILVA et al., 2017b) e realização de ensaios específicos como imunofluorescência e DNA *combing* (CALDERANO et al., 2015; DA SILVA et al., 2017b, 2019; DE ARAUJO; CALDERANO; ELIAS, 2019).

Na fase S também há a presença de um ponto de checagem, chamado intra-S (do inglês *intra-S checkpoint*). Porém, diferentemente do ponto de checagem G1/S, na checagem intra-S a célula não para em determinado ponto do ciclo (ou seja, não fica presa) (IYER; RHIND, 2017). Esse mecanismo de checagem é caracterizado majoritariamente pela diminuição da taxa de replicação e regulação diferencial no disparo das origens de replicação. A célula ativa este *checkpoint* em resposta a danos no DNA durante a fase S (estresse replicativo), protegendo assim a integridade do genoma e garantindo uma replicação fidedigna do DNA (IYER; RHIND, 2017). A detecção deste ponto de checagem por análise do conteúdo de DNA utilizando citometria de fluxo é elusiva e geralmente necessita de ensaios complementares, pois frequentemente o perfil dos histogramas das

células com estresse replicativo mostra apenas um leve aumento no número de células em S (Figura 2A, C) (HALICKA et al., 2016; DIAS et al., 2019).

Outro ponto interessante é que alguns tripanosomatídeos como, por exemplo, *T. brucei* e algumas espécies de *Leishmania*, replicam e dividem totalmente o cinetoplasto antes mesmo do término da fase S (aqui, a fase S a qual nos referimos refere-se exclusivamente a replicação do DNA presente no núcleo e não ao DNA presente no cinetoplasto) (DA SILVA et al., 2017c, 2019). Outro evento que ocorre durante a fase S nos tripanosomatídeos é a duplicação flagelar, que ocorre normalmente no meio da fase S (WOODWARD; GULL, 1990; DA SILVA et al., 2013; JONES et al., 2014). Ainda não se sabe por completo o mecanismo que regula e restringe a realização de apenas uma divisão das organelas de cópia-única (por exemplo, núcleo, cinetoplasto e flagelo) por ciclo celular nos tripanosomatídeos.

Assim, ao final da fase S, de maneira geral, uma célula de um tripanosomatídeo (*T. brucei*, *T. cruzi* e a maioria das espécies de *Leishmania*) apresentará um núcleo com seus cromossomos totalmente replicados, dois cinetoplastos e dois flagelos. Curiosamente, uma pequena proporção da população de *L. amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 se comporta de maneira um pouco diferente, dividindo o núcleo antes da divisão do cinetoplasto. Em outras palavras, essa pequena parte da população de *L. amazonensis* apresentará ao final da fase S apenas um cinetoplasto ao invés de dois (DA SILVA et al., 2013). Outro detalhe interessante é que a fase S costuma ser a segunda fase do ciclo celular com maior tempo de duração nos tripanosomatídeos (DA SILVA et al., 2017b).

### 2.3 FASE G2 (GAP 2)

Em eucariotos modelos, a fase G2 é caracterizada pela duplicação dos centríolos e outras organelas citoplasmáticas. Além disso, é retomada intensa transcrição e síntese de moléculas necessárias para a segregação dos cromossomos e divisão celular propriamente dita. Todo esse processo resulta em aumento do volume e tamanho celular (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Em tripanosomatídeos, proteínas homólogas àquelas utilizadas pelos eucariotos modelos na biogênese do centríolo são encontradas associadas à biogênese do corpo basal e flagelo, já que tanto o corpo basal/flagelo como os centríolos, são compostos por microtúbulos (HU et al., 2015). Nesses organismos também ocorre um aumento de volume e tamanho celular decorrentes da alta atividade transcricional e intensa síntese proteica (LODISH et al., 2000).

Ao contrário dos eucariotos modelos, onde G2 é normalmente a fase mais curta do ciclo celular, em tripanosomatídeos essa fase varia muito em relação ao seu tempo de duração (DA SILVA et al., 2017b). Em *L. amazonensis*, G2 e M possuem o mesmo tempo de duração e são, de fato, as fases mais curtas do ciclo. Porém, em *T. brucei* e *T. cruzi*, G2 é, respectivamente, a quarta e terceira fase mais longa do ciclo celular (DA SILVA et al., 2017b).

Assim como ocorre em G1, na etapa final da fase G2 também há um ponto de checagem (do inglês G2/M *checkpoint*) que visa majoritariamente averiguar a presença de danos no DNA e checar se a replicação do DNA ocorreu de forma correta (STARK; TAYLOR, 2004; LÖBRICH; JEGGO, 2007). Caso haja algum problema com o DNA, a célula cessa a progressão no ciclo, ficando “presa” no final de G2 enquanto este dano não for reparado (STARK; TAYLOR, 2004; LÖBRICH; JEGGO, 2007). Da mesma forma como mencionado na fase G1, existem diversos mecanismos de reparo de DNA que atuam em G2, sendo que a atuação específica de cada um deles vai depender do tipo de dano presente no DNA (STARK; TAYLOR, 2004). Células presas no ponto de checagem G2/M também podem ser facilmente visualizadas através de uma análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo (Figura 2A, D) (LI et al., 2017). Em tripanosomatídeos, alguns estudos identificaram a presença deste ponto de checagem no final de G2 (G2/M *checkpoint*) (GLOVER; HORN, 2014; MARIN et al., 2018). Como esperado, este ponto de checagem está relacionado com a presença de danos no DNA na forma de dupla-fita e ação do reparo por recombinação homóloga (GLOVER; HORN, 2014; MARIN et al., 2018).

No final de G2, se a célula não apresentar anomalias relacionadas ao DNA e apresentar ambiente intracelular e tamanho favoráveis à sua divisão, ela segue para a próxima fase, a mitose (LODISH et al., 2000).

## 2.4 FASE M (MITOSE) E C (CITOCINESE)

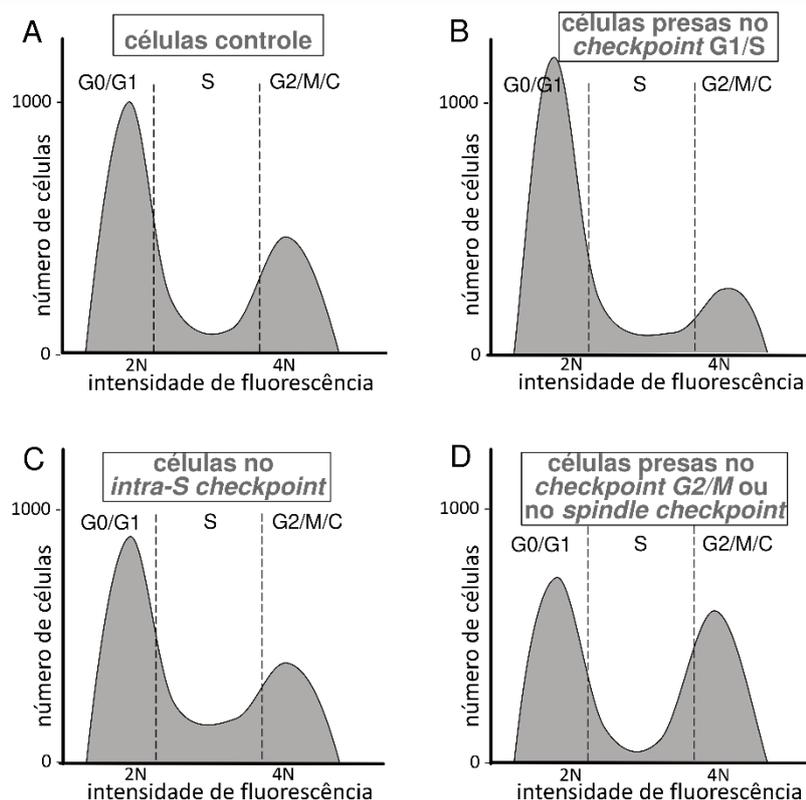
A mitose é o processo pelo qual as células eucarióticas dividem os cromossomos entre as células filhas. Em eucariotos modelos, a mitose, em geral, é subdividida em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase (LODISH et al., 2000; RICHARD MCINTOSH, 2016). Alguns autores incluem a citocinese como uma subfase extra da mitose, ocorrendo concomitantemente e após a telófase (OLIFERENKO; CHEW; BALASUBRAMANIAN, 2009). Outros autores incluem a citocinese como a última fase do ciclo celular (após a mitose), mesmo havendo uma sobreposição entre elas (citocinese se sobrepõe à mitose)

(GUERTIN; TRAUTMANN; MCCOLLUM, 2002). Independentemente, a citocinese consiste na efetiva divisão da célula, gerando duas células filhas após a formação completa de dois núcleos (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Em tripanosomatídeos, a citocinese ocorre após a segregação cromossômica mitótica por meio da entrada unidirecional de um sulco de clivagem ao longo do eixo helicoidal da célula, no sentido anterior para posterior (HAMMARTON, 2007). Mitose e citocinese costumam ser as fases do ciclo celular com os menores tempo de duração nesses parasitos (DA SILVA et al., 2017b).

Como as subdivisões mitóticas são pouco estudadas nos tripanosomatídeos, não iremos abordá-las especificamente aqui. Contudo, vale a pena destacar algumas características importantes relacionadas a prófase e metáfase presente nos eucariotos modelos e tripanosomatídeos. Os cromossomos dos tripanosomatídeos não se condensam na prófase como ocorre nos eucariotos modelos (HECKER; GANDER, 1985). Na verdade, a cromatina dos tripanosomatídeos sequer forma fibras de 30 nm como em outros eucariotos (HECKER; GANDER, 1985). Outra característica interessante é que nos eucariotos modelos há a desintegração da membrana nuclear, mas na maioria dos tripanosomatídeos a membrana nuclear permanece intacta durante a mitose, caracterizando um processo denominado mitose fechada (SOLARI, 1995; ALSFORD et al., 2012). Consequentemente, na metáfase dos tripanosomatídeos também não há o alinhamento dos cromossomos na região equatorial da célula, como nos demais eucariotos (DA SILVA; CANO, 2017).

Em eucariotos modelos, vale a pena destacarmos um ponto de checagem importante que ocorre na mitose: o ponto de checagem do fuso (do inglês *spindle checkpoint*). A checagem do fuso “prende” a célula no final da metáfase e atrasa o início da anáfase em resposta a defeitos nos anexos cinetocoro-microtúbulos, que têm como principal função se ligar aos microtúbulos do fuso para que as cromátides irmãs segreguem corretamente durante a anáfase (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Em outras palavras, esse ponto de checagem visa averiguar se a célula apresenta algum defeito antes de entrar na citocinese, prevenindo assim que haja uma divisão nuclear anômala antes da célula se dividir por completo (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). Curiosamente, por meio de análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo não há como diferenciar células presas no ponto de checagem do fuso ou na checagem G2/M, uma vez que o conteúdo de DNA das células em ambos os pontos hipoteticamente é o mesmo (Figura 2a, d).

Em *T. brucei* já foi proposto que esse ponto de checagem está aparentemente ausente (PLOUBIDOU et al., 1999). Além disso, a maioria das proteínas que realizam a checagem do fuso não apresentam homólogos no genoma dos tripanosomatídeos, o que corrobora essa hipótese e sugere que estes organismos não conseguem atrasar a citocinese, mesmo quando há erros na divisão nuclear (HAYASHI; AKIYOSHI, 2018). Contudo, um estudo recente realizado em *T. cruzi* sugere que a ação de uma proteína pleotrópica específica pode prender as células no início da citocinese (TAVERNELLI et al., 2019). De fato, o mesmo estudo que destaca a ausência de proteínas homólogas participantes deste ponto de checagem em tripanosomatídeos, propõe que estes organismos regulam o tempo da divisão nuclear através da modulação de uma ciclina específica chamada CYC6 (HAYASHI; AKIYOSHI, 2018). Em outras palavras, os tripanosomatídeos provavelmente controlam a progressão para citocinese através de ciclinas multifuncionais que regulam o ciclo celular.



**Figura 2.** Histogramas hipotéticos ilustrando o perfil do conteúdo de DNA (analisado por citometria de fluxo) de populações de células presas em diferentes pontos de checagem do ciclo celular.

A. Células selvagens (controle). B. Células presas no ponto de checagem G1/S (do inglês *G1/S checkpoint*). C. Células presas no ponto de checagem intra-S (do inglês *intra-S checkpoint*). D. Células presas nos pontos de checagem G2/M (do inglês *G2/M checkpoint*) ou no ponto de checagem de fuso (do inglês *spindle checkpoint*). Vale destacar que o perfil do conteúdo de DNA nesses dois pontos de checagem é o mesmo.

Mais estudos são necessários para constatar se os tripanosomatídeos possuem, de fato, um ponto de checagem na mitose/citocinese. Contudo, fica evidente que os mecanismos de regulação desempenham um papel muito importante no controle da progressão do ciclo celular nesses organismos.

## 2.5 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo celular é regulado por intrincadas vias de transdução de sinais que coordenam com precisão a complexa série de eventos envolvidos na duplicação celular (LODISH et al., 2000). De um modo geral, podemos dizer que uma célula inicia uma nova divisão celular diretamente a partir do término de um ciclo anterior (célula em G1) ou a partir de uma condição quiescente (G0) sob o estímulo de fatores de crescimento (Figura 1A) (LODISH et al., 2000). Diversos estudos apontam que as transições das fases do ciclo celular são determinadas por limiares de concentração e atividade de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (do inglês *cyclin dependent kinases*) (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; MALUMBRES, 2014). Resumidamente, ao fim de G1, após uma célula se comprometer irreversivelmente com o ciclo celular, o complexo ativado ciclina-E/CDK2 determinará a transição G1/S; ciclina-A/CDK1 e ciclina-A/CDK2 ordenarão a progressão em S (replicação do DNA), enquanto ciclina-B/CDK1 promoverá o desenvolvimento ordenado da mitose, garantindo a segregação correta dos cromossomos entre as duas células-filhas (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

Genes ortólogos de muitas CDKs estão presentes no genoma dos tripanosomatídeos, mas algumas de suas funções são divergentes (HAMMARTON; MOTTRAM; DOERIG, 2003; HAMMARTON et al., 2005; KUMAR; WANG, 2006) e podem diferir de acordo com os estágios do ciclo de vida do parasito em questão (HAMMARTON, 2007). Contudo, vários trabalhos apontam que o ciclo celular dos tripanosomatídeos também são regulados pelas CDKs, sendo que a modulação da atividade dessas CDKs aparentemente é espécie-específica (GÓMEZ et al., 2001; MCKEAN, 2003; GRANT et al., 2004; MAITY; GOSWAMI; SAHA, 2011; LI, 2012).

Dentre os tripanosomatídeos, *T. brucei* é o que apresenta a regulação do ciclo celular mais bem caracterizada, possuindo onze quinases relacionadas a CDK1 (CRK1-4 e CRK6-12) (PARSONS et al., 2005) e 10 ciclinas identificadas (CYC2-11) (HAMMARTON, 2007) (Tabela 1). CRK3 demonstrou ser dependente de ciclinas, interagindo com o CYC2 e CYC6

(HAMMARTON et al., 2003; HAMMARTON; MOTTRAM; DOERIG, 2003). Além disso, a modulação de CYC6, como mencionado anteriormente, tem a habilidade de regular o tempo da divisão nuclear nos tripanosomatídeos (HAYASHI; AKIYOSHI, 2018; WHEELER; GULL; SUNTER, 2019). Contudo, mais estudos são necessários para se estabelecer outras associações entre ciclinas e CRKs, não apenas em *T. brucei*, mas também nos demais tripanosomatídeos.

**Tabela 1.** Classificação das ciclinas em *T. brucei*.

| Ciclina | Função predita      | Número GeneDB |
|---------|---------------------|---------------|
| CYC2    | fase G1             | Tb11.01.5660  |
| CYC3    | Mitose              | Tb927.6.1460  |
| CYC4    | Similar à CYC2      | Tb927.7.7170  |
| CYC5    | Similar à CYC2      | Tb10.26.0510  |
| CYC6    | Mitose              | Tb11.01.8460  |
| CYC7    | Similar à CYC2      | Tb927.6.5020  |
| CYC8    | Mitose              | Tb927.7.1590  |
| CYC9    | Similar à ciclina C | Tb11.01.5600  |
| CYC10   | Similar à CYC2      | Tb927.8.6340  |
| CYC11   | Similar à CYC2      | Tb927.8.6350  |

Fonte: Hammarton, 2007

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avanços significantes relacionados a uma melhor compreensão do ciclo celular dos parasitos tripanosomatídeos têm sido realizados nos últimos anos. Parece estar claro que existem diferenças significativas em diversas etapas do ciclo celular quando comparamos os parasitos tripanosomatídeos e seus hospedeiros mamíferos. Possivelmente algumas dessas diferenças poderão ser exploradas no futuro com intuito de desenvolver novos alvos antiparasitários. A biologia celular e molecular dos tripanosomatídeos é altamente intrigante e peculiar. Diversas vias e componentes importantes relacionados aos pontos de checagem e regulação do ciclo celular em eucariotos modelos não são conservados em tripanosomatídeos, o que sugere que estes organismos selecionaram estratégias únicas para regular o ciclo celular e averiguar a integridade de suas organelas. Talvez este seja

mais um ponto a ser explorado no combate a esses parasitos que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo.

## 4. AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Dra. Débora Andrade Silva pelas discussões e sugestões, as quais foram extremamente significativas para a elaboração final deste capítulo.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALSFORD, S. et al. Epigenetic mechanisms, nuclear architecture and the control of gene expression in trypanosomes. **Expert reviews in molecular medicine**, v.14, p.e13, 2012.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods in Molecular Biology**, v. 1170, p. 29–40, 2014.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. **FEBS Letters**, v.491, p.117-122, 2001.
- BROWNE, A. J. et al. The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. **Scientific Data**, v. 4, p.e170050, 2017.
- CALDERANO, S. G. et al. Single molecule analysis of *Trypanosoma brucei* DNA replication dynamics. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n.5, p.2655-2665, 2015.
- COSTER, G.; DIFFLEY, J. F. X. Bidirectional eukaryotic DNA replication is established by quasi-symmetrical helicase loading. **Science**, v. 357, n. 6348, p. 314–318, 2017.
- DA SILVA, M. S.; CANO, M. I. N. Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids. **Bentham Science Publishers**, 2017.
- DA SILVA, M. S. et al. Leishmania amazonensis Promastigotes Present Two Distinct Modes of Nucleus and Kinetoplast Segregation during Cell Cycle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013.
- DA SILVA, M. S. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. **Trends in Parasitology**, v.33, n.11, p.858-874, 2017a.
- DA SILVA, M. S. et al. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 756–770, 2017b.
- DA SILVA, M. S. et al. Consequences of acute oxidative stress in Leishmania amazonensis: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 138–150, 2017c.

- DA SILVA, M. S. et al. Transcription activity contributes to the firing of non-constitutive origins in African Trypanosomes helping to maintain robustness in S-phase duration. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18512, 2019.
- DE ARAUJO, C. B.; CALDERANO, S. G.; ELIAS, M. C. The Dynamics of Replication in *Trypanosoma cruzi* Parasites by Single-Molecule Analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 514–518, 2019.
- DIAS, M. H. et al. Fibroblast Growth Factor 2 lethally sensitizes cancer cells to stress-targeted therapeutic inhibitors. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 2, p. 290–306, 2019.
- FRAGKOS, M. et al. DNA replication origin activation in space and time. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 360–374, 2015.
- GENOIS, M.-M. et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 78, n. 1, p. 40–73, 2014.
- GLOVER, L.; HORN, D. Locus-specific control of DNA resection and suppression of subtelomeric VSG recombination by HAT3 in the African trypanosome. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 20, p. 12600–12613, 2014.
- GÓMEZ, E. B. et al. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 97–108, 2001.
- GRANT, K. M. et al. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: Chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3033–3042, 2004.
- GUERTIN, D. A.; TRAUTMANN, S.; MCCOLLUM, D. Cytokinesis in Eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 155–178, 2002.
- HALICKA, D. et al. DNA damage response resulting from replication stress induced by synchronization of cells by inhibitors of DNA replication: Analysis by flow cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 1524p. 107–119, 2007.
- HAMMARTON, T. C. et al. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22877–22886, 2003.
- HAMMARTON, T. C. et al. *Trypanosoma brucei* MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 104–116, 2005.
- HAMMARTON, T. C. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, n. 1, p. 1–8, 2007.
- HAMMARTON, T. C.; MOTTRAM, J. C.; DOERIG, C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. **Progress in cell cycle research**, v.5, 91-101, 2003.
- HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v.23, n.7, p.345-356, 2013.

- HAYASHI, H.; AKIYOSHI, B. Degradation of cyclin B is critical for nuclear division in *Trypanosoma brucei*. **Biology Open**, v. 7, n. 3, p.e031609, 2018.
- HE, C. Y. et al. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Biology**, v. 165, n. 3, p. 313–321, 2004.
- HECKER, H.; GANDER, E. S. The compaction pattern of the chromatin of Trypanosomes. **Biology of the Cell**, v. 53, n. 3, p. 199–208, 1985.
- HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, n.11, p.910-916, 2008.
- HU, H. et al. The centriole cartwheel protein SAS-6 in trypanosoma brucei is required for probasal body biogenesis and flagellum assembly. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 9, p. 898–907, 2015.
- IYER, D. R.; RHIND, N. The intra-S checkpoint responses to DNA damage. **Genes**, 2017.
- JONES, N. G. et al. Regulators of *Trypanosoma brucei* cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 1, p.e1003886, 2014.
- KALUCKA, J. et al. Metabolic control of the cell cycle. **Cell Cycle**, v. 14, n. 21, p. 3379–3388, 2015.
- KHARE, S. et al. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229–233, 2016.
- KUMAR, P.; WANG, C. C. Dissociation of cytokinesis initiation from mitotic control in a eukaryote. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 1, p. 92–102, 2006.
- LI, Y. et al. Cardamonin induces ROS-mediated G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF-κB pathway in nasopharyngeal carcinoma. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e3024, 2017.
- LI, Z. Regulation of the Cell Division Cycle in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 10, p. 1180–1190, 2012.
- LÖBRICH, M.; JEGGO, P. A. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. **Nature Reviews Cancer**, 2007.
- LODISH, H. et al. **Overview of the Cell Cycle and Its Control**. In: Molecular Cell Biology. Section 13.1.
- LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitology Journal**, v.4, p. 30-59, 2010.
- MAITY, A. K.; GOSWAMI, A.; SAHA, P. Identification of substrates of an S-phase cell cycle kinase from *Leishmania donovani*. **FEBS Letters**, v. 585, n. 17, p. 2635–2639, 2011.
- MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p.e122, 2014.
- MARIN, P. A. et al. Recruitment kinetics of the homologous recombination pathway in procyclic forms of trypanosoma brucei after ionizing radiation treatment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.e5405, 2018.

- MCKEAN, P. G. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, n.6, p.600-607, 2003.
- OLIFERENKO, S.; CHEW, T. G.; BALASUBRAMANIAN, M. K. Positioning cytokinesis. **Genes and Development**, v.23, p.660-674, 2009.
- OPPERDOES, F. R. et al. Comparative Metabolism of Free-living *Bodo saltans* and Parasitic Trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 657–678, 2016.
- PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v.6, p.e127, 2005.
- PLANAS-SILVA, M. D.; WEINBERG, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 768–772, 1997.
- PLOUBIDOU, A. et al. Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. **Journal of cell science**, p. 4641–50, 1999.
- RICHARD MCINTOSH, J. Mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n.9, 2016.
- ROBINSON, N. P.; BELL, S. D. Origins of DNA replication in the three domains of life. **FEBS Journal**, v.272, n.15, p.3757-3766, 2005.
- SIMPSON, A. et al. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 407–422, 2004.
- SOLARI, A. J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. **Biocell**, v.19, n.2, p.65-84, 1995.
- STANOJCIC, S. et al. Single-molecule analysis of DNA replication reveals novel features in the divergent eukaryotes *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* versus mammalian cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23142, 2016.
- STARK, G. R.; TAYLOR, W. R. Analyzing the G2/M checkpoint. **Methods in Molecular Biology**, v.280, p.51-82, 2004.
- TAVERNELLI, L. E. et al. Overexpression of *Trypanosoma cruzi* High Mobility Group B protein (TcHMGB) alters the nuclear structure, impairs cytokinesis and reduces the parasite infectivity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- TIENGWE, C. et al. Genome-wide Analysis Reveals Extensive Functional Interaction between DNA Replication Initiation and Transcription in the Genome of *Trypanosoma brucei*. **Cell Reports**, v. 2, n. 1, p. 185–197, 2012.
- TIENGWE, C.; MARQUES, C. A.; MCCULLOCH, R. Nuclear DNA replication initiation in kinetoplastid parasites: new insights into an ancient process. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 27–36, 2014.
- UZCANGA, G. et al. Nuclear DNA replication and repair in parasites of the genus *Leishmania*: Exploiting differences to develop innovative therapeutic approaches. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 2, p. 156–177, 2017.

- VAUGHAN, S.; GULL, K. Basal body structure and cell cycle-dependent biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Cilia**, v.5, p.e5, 2016.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79581, 2013.
- WHEELER, R. J.; GULL, K.; SUNTER, J. D. Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 133–154, 2019.
- WOODWARD, R.; GULL, K. Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v.95, p. 49–57, 1990.

## ASPECTOS CELULARES DOS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE). CAPTAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE MACROMOLÉCULAS

Miria Gomes Pereira<sup>1</sup>, Carolina de Lima Alcantara<sup>1</sup>

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Rio de Janeiro, Brasil.

### RESUMO

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas humana. O parasito apresenta quatro formas de desenvolvimento de acordo com o hospedeiro ou com a fase do ciclo biológico em que se encontra. A forma epimastigota é encontrada no trato digestório do hospedeiro invertebrado (triatomíneo), sendo responsável pela proliferação, aumento da carga parasitária e colonização do vetor. A capacidade de sobreviver à microbiota dos triatomíneos, à produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, à produção de eicosanoides, assim como a presença de um aparato endocítico especializado conferem ao protozoário o sucesso necessário para se estabelecer nos triatomíneos. Neste capítulo, abordaremos aspectos gerais associados à captação de nutrientes já mostrados na literatura e discutiremos sobre o complexo citóstoma-citofaringe como porta de entrada de macromoléculas por endocitose nos epimastigotas. A captação de proteínas e lipídios que sustentam o metabolismo do parasito se dá por este domínio da membrana, direcionando o conteúdo para organelas semelhantes a lisossomos – os reservossomos –, onde a carga endocitada será digerida e distribuída para a célula.

**Palavras-chave:** Endocitose, Citóstoma-citofaringe e Doença de Chagas.

### ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease. The parasite presents four developmental forms according to the host or the biological cycle stage. The epimastigote form is found in the digestive tract of invertebrate host or triatomine, being responsible for proliferation, increase of parasite load or vector colonization. The survival capacity to the triatomine's microbiote, to production of oxygen and nitrogen reactive species, to eicosanoid production, as well as the presence of a specialized endocytic apparatus confers to the cell the success to establishment in triatomine. In this chapter, we will address general aspects associated with nutrient uptake shown in the literature, and we will discuss about the cytostome-cytopharynx complex as the entry site of macromolecules by endocytosis in

epimastigotes. The uptake of proteins and lipids that sustain parasite metabolism is result of this membrane domain, directing the organelle content into lysosome like organelles – the reservosomes, where the endocytic cargo is digested and distributed to the cell.

**Keywords:** Endocytosis, Cytostome-cytopharynx and Chagas disease

## 1. INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Descrito por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909), é responsável por, aproximadamente 6 a 8 milhões de indivíduos infectados, em especial na América Latina, onde o inseto vetor pode ser naturalmente encontrado. Além disso, a doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças mundiais negligenciadas, as quais prevalecem em países localizados em áreas tropicais e subtropicais contabilizando mais de 1 bilhão de indivíduos contaminados em cerca de 150 nações. Geralmente, a população acometida se encontra em situação de pobreza, sem saneamento e educação básicos adequados. Vivem em contato próximo aos vetores infecciosos, aos animais domésticos infectados ou dependem direta ou indiretamente da economia pecuarista (OMS, 2020).

Ao longo dos últimos 110 anos, *T. cruzi* tem sido objeto de estudo para diversos grupos de pesquisa no Brasil e em outras localizações do globo. Na classificação taxônomica atual, *T. cruzi* pertence ao domínio Eukaryota, reino Excavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea (subclasse Metakinetoplastea), ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (MOREIRA; LOPEZ-GARCIA; VICKERMAN, 2004; SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006; LUKES et al., 2014).

A capacidade de infectar insetos vetores hematófagos da ordem Hemiptera (família Reduviidae, subfamília Triatominae), os quais compreendem mais de 140 espécies, favorece a ampla distribuição do parasito nas Américas Central e Sul (Coura, 2015). Além disso, a variedade de cepas do parasito e sua variabilidade genética estão associadas intimamente à virulência e ao quadro clínico no hospedeiro vertebrado, levando à fase crônica sintomática cardíaca ou digestiva (megacólon ou megaesôfago), sem excluir as alterações neuroendócrinas de médio e longo prazo (ZINGALES et al., 2012; PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). O resultado disso é a existência de um conjunto de populações circulantes entre os hospedeiros invertebrado e vertebrado, que permeiam no ciclo silvestre e no doméstico, com elevado grau de sucesso na evolução e na patogenicidade. Exemplo

desse sucesso é a existência de apenas dois fármacos para tratamento da doença, embora de ação limitadas: o benzonidazol e o nifurtimox. O benzonidazol é o único comercializado no Brasil. Ambos têm eficácia quase exclusiva na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. O benzonidazol pode ocasionar efeitos colaterais severos, como mielossupressão, neurite periférica, descamação cutânea, coceira, formigamento (parestesia), fraqueza muscular (astenia), náuseas, vômitos. O tratamento longo e os efeitos colaterais representam os maiores empecilhos à adesão dos pacientes à quimioterapia antiparasitária (VIOTTI et al., 2009; PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Somado aos fatores previamente citados, *T. cruzi* apresenta quatro formas principais de desenvolvimento e diversas formas intermediárias. As formas associadas ao inseto vetor, como os epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos; e as formas encontradas nos mamíferos, como os amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. Os tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos são morfologicamente similares, infecciosos e não replicativos. Já os amastigotas e epimastigotas são formas proliferativas e com capacidade de captar nutrientes por endocitose. Os amastigotas são comumente encontrados no citosol de células nucleadas de órgãos e tecidos dos hospedeiros vertebrados, são células arredondadas ou ovaladas e com capacidade de infecção (DE SOUZA, 2002).

As alterações morfológicas de *T. cruzi* acompanhadas das alterações na transcrição de genes e das proteínas expressas são fundamentais para o processo adaptativo do parasito. Observam-se mudanças no posicionamento e morfologia das organelas, no remodelamento do citoesqueleto, no repertório de glicoconjugados na membrana, como as mucinas, GIPLs (*glycosylphosphatidil inositol phospholipids*), MASPs (*mucin associated surface proteins*), glicoproteínas da família das trans-sialidases e lectinas que são importantes tanto durante o ciclo nos triatomíneos quanto nos mamíferos, pois ora participam do reconhecimento de moléculas de superfície do trato gastrointestinal dos triatomíneos ora nos mamíferos. Além disso, algumas famílias de proteínas estão associadas ao estabelecimento da infecção e à sobrevivência do parasito em qualquer dos hospedeiros (ATWOOD et al, 2005; MINNING et al, 2009; BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA; 2013; AMORIM et al, 2017).

Essas modificações conferem uma maior capacidade de adaptação a:

- i) diferentes meios e temperatura corporal, seja no trato digestório dos triatomíneos, seja no hospedeiro vertebrado mamífero;

- ii) a diferenças de osmolaridade e de pH ao longo do trato digestório do vetor e nos tecidos infectados por tripomastigotas e amastigotas nos vertebrados;
- iii) à resistência a enzimas digestivas e à microbiota intestinal, quando o parasito se encontra nos triatomíneos;
- iv) à competição nutricional, tanto nos triatomíneos quanto no citosol das células infectadas;
- v) ao escape do sistema imunológico dos triatomíneos e, especialmente, do mamífero, onde a fase clínica da doença se estabelece.

No contexto do ciclo do parasito no inseto vetor, as formas epimastigotas assumem grande relevância, pois são essenciais para a colonização do triatomíneo, aumento da carga parasitária e diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese). A captação de nutrientes é decorrente, sobretudo, dos hábitos alimentares do triatomíneo e do aparato endocítico de *T. cruzi*. Neste capítulo, abordaremos os aspectos relacionados à captação de nutrientes e discutiremos a relevância do complexo citóstoma-citofaringe como porta de entrada de macromoléculas por endocitose nos epimastigotas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS CELULARES DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

A forma epimastigota é encontrada naturalmente no trato digestório dos triatomíneos ou pode ser mantida em cultivos axênicos para ensaios *in vitro*. É uma célula alongada, em forma de fuso, medindo entre 20 a 40  $\mu\text{m}$  dependendo da cepa, com diâmetro médio de 5  $\mu\text{m}$  (DE SOUZA, 2002).

A membrana plasmática de *T. cruzi* está intimamente conectada ao citoesqueleto celular. A morfologia dos epimastigotas é resultado da distribuição da rede de microtúbulos que se posiciona abaixo da membrana plasmática, sendo, desta forma, designados por microtúbulos subpeliculares (ANGELOPOULOS, 1970). A distribuição dos microtúbulos se assemelha a uma gaiola, restringindo as áreas livres da membrana onde não é possível se observar os contatos dos microtúbulos com a bicamada lipídica (DE SOUZA, 2002). Os

tripanosomatídeos, em geral, são células polarizadas. Isso significa que a maioria das organelas e estruturas celulares estão localizadas em regiões específicas da célula (DE SOUZA, 2002). Por convenção, a região anterior é aquela onde o flagelo, após emergir da bolsa flagelar, se torna livre. Em epimastigotas, a bolsa flagelar é assimétrica e o flagelo emerge lateralmente. O corpúsculo basal, o cinetoplasto, o complexo de Golgi e o complexo do Vacúolo Contrátil estão localizados na região anterior, próximos à bolsa flagelar. O núcleo tem formato arredondado e está localizado posteriormente ao cinetoplasto (Figura 1).

## 2.2 ASPECTOS GERAIS DA VIA ENDOCÍTICA DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Seguindo a polarização celular intrínseca, a via endocítica de epimastigotas de *T. cruzi* é composta por organelas e estruturas que estão distribuídas ao longo do eixo antero-posterior da célula e, portanto, tem-se uma via endocítica polarizada (DE SOUZA; SANTA'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

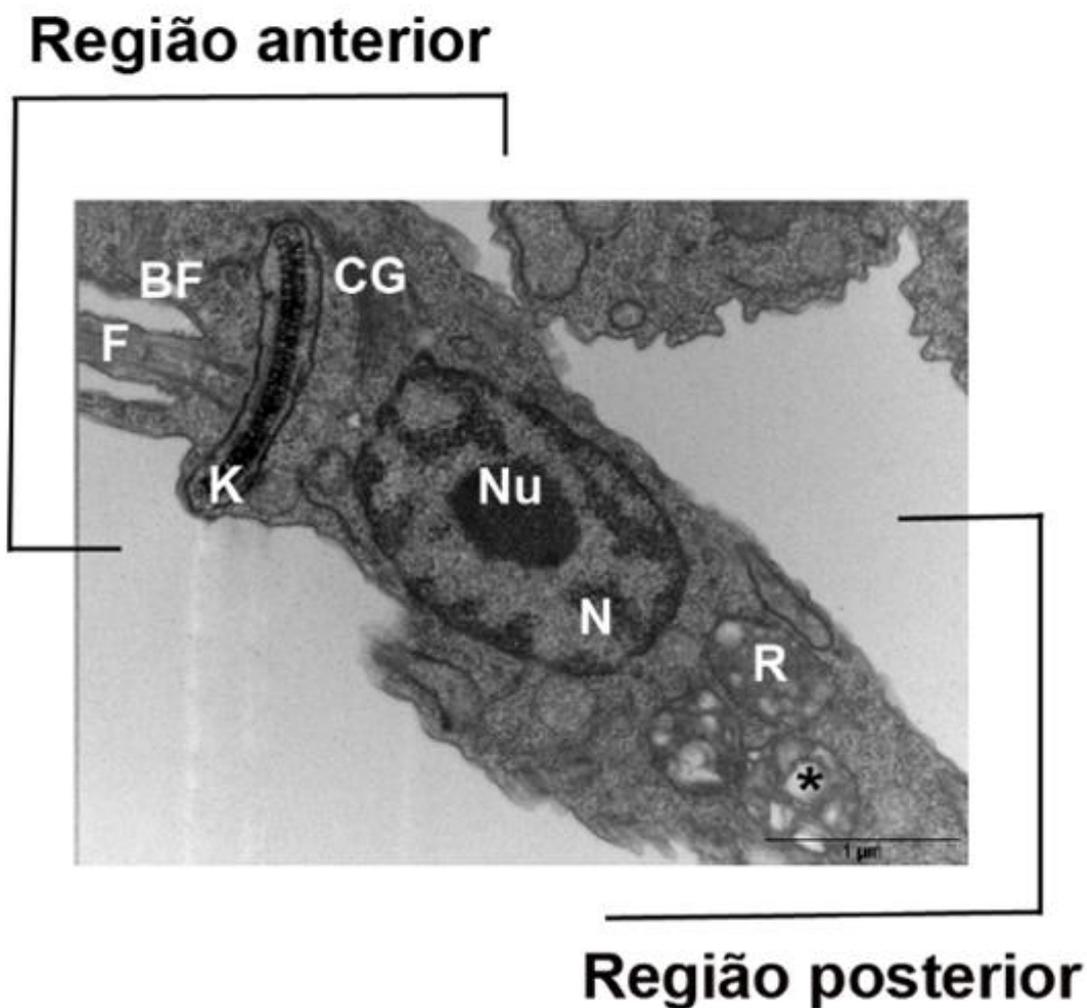
Na célula epimastigota, a membrana plasmática pode ser dividida em quatro subdomínios:

- i) A membrana do corpo celular;
- ii) A membrana do flagelo;
- iii) A membrana da bolsa flagelar;
- iv) A membrana do complexo citóstoma-citofaringe.

Embora contínuos, esses domínios possuem composições diferenciadas que lhes conferem funções particulares e certo grau de compartimentalização.

Esses domínios estabelecem importantes conexões com as células do hospedeiro invertebrado. Por exemplo, a adesão do flagelo dos epimastigotas à membrana perimicrovilar dos triatomíneos é um importante evento que representa um dos sinais que regulam e desencadeiam a metaciclogênese (diferenciação da forma epimastigota em tripomastigota metacíclico). O estresse nutricional, o balanço redox, a osmolaridade, a variação do pH são fatores que estão associados a este fenômeno nos triatomíneos. Alguns autores sugerem que a metaciclogênese possa ser estimulada por ativadores da adenilato ciclase e por análogos de AMPc (GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988; RANGEL-ALDAO et al., 1987; RANGEL-ALDAO et al., 1988). Mais recentemente,

Hamedi e colaboradores (2015) correlacionaram o estresse nutricional com a ativação da adenilato ciclase e aumento de AMPc em epimastigotas antes da diferenciação para tripomastigotas metacíclicas. Somado a isso, a adenilato ciclase foi localizada na membrana do flagelo desses parasitos, assim como a presença de microdomínios de membrana ou *lipid rafts* no flagelo de *T. cruzi* e de *T. brucei* (causador da doença do sono no continente africano) (BRUCE, 1895). Esses microdomínios implicam em processos de sinalização celular que se estendem para o restante do corpo dos epimastigotas de *T. cruzi* (JIMENEZ, 2014).



**Figura 1:** Corte longitudinal de um epimastigota da cepa Y de *T. cruzi* após o processamento para microscopia eletrônica de transmissão.

Nesta imagem, apenas parte do parasito é visualizada. Na região anterior, observam-se o complexo de Golgi (CG), a bolsa flagelar (BF), o flagelo (F), o cinetoplasto (K). Na região central, situa-se o núcleo (N), contendo o nucléolo (Nu). No lado oposto à saída do flagelo, encontram-se os reservossomos (R) contendo proteínas e lipídios (asterisco) no lúmen.

O domínio da bolsa flagelar representa um importante ponto de entrada e saída de moléculas nos tripanossomatídeos. Isso porque é uma região da membrana celular onde os microtúbulos subpeliculares não estão presentes, permitindo assim o brotamento e fusão de vesículas. Em *T. brucei* e *Leishmania* sp. constitui o único sítio para a captação de nutrientes por endocitose e fusão de vesículas da via secretória (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

Em contrapartida, em *T. cruzi*, a bolsa flagelar tem uma menor ou nenhuma contribuição na captação de nutrientes por endocitose, sendo o complexo citóstoma-citofaringe o principal sítio nessas formas (PORTO-CARREIRO et al., 2000).

É importante destacar que o correto posicionamento do flagelo, da bolsa flagelar e do complexo citóstoma-citofaringe é fundamental para a viabilidade, captação de nutrientes e proliferação celular dos epimastigotas. Em ensaios que levaram à geração de epimastigotas mutantes para a glicoproteína gp72 e para as proteínas que formam a estrutura paraflagelar (PRF 1 ou PRF 2) observou-se que a endocitose foi severamente comprometida, a adesão do flagelo ao corpo pela zona de adesão flagelar não ocorreu e a motilidade diminuiu. Inclusive, os epimastigotas não foram capazes de aderir à membrana perimicrovilar, o que implica negativamente no estabelecimento do parasitismo nos triatomíneos (DE JESUS et al., 1993; ROCHA et al., 2010; LANDER et al., 2015).

### **2.2.1 A entrada de macromoléculas – O complexo citóstoma-citofaringe**

Adjacente à bolsa flagelar, observa-se uma região da membrana plasmática com um proeminente glicocálix, muito mais abundante do que no restante do corpo do parasito. Esse domínio é conhecido como borda pré-oral e se estende desde a membrana da bolsa flagelar até a entrada do citóstoma, sendo contínuo com este (ALCANTARA et al., 2014).

O citóstoma consiste em uma abertura na superfície celular seguida de uma invaginação que se aprofunda para o interior da célula, formando um túnel, a citofaringe, de onde brotam vesículas contendo material captado por endocitose (MILDER; DEANE, 1969) (Figura 2A e 2B).

A citofaringe pode alcançar a região posterior da célula e está amparado por dois conjuntos de microtúbulos: i) um triplete que tem origem abaixo da membrana onde situa-se o citóstoma; ii) um quarteto que se origina abaixo da bolsa flagelar e segue em direção à borda pré-oral alcançando a citofaringe (ALCANTARA et al., 2014).

O arranjo tridimensional destes microtúbulos proporciona uma estrutura de apoio para a citofaringe e se assemelha a uma calha. No lado livre de microtúbulos, é possível observar diversas vesículas associadas ao tráfego de macromoléculas em direção ao complexo citóstoma-citofaringe ou em direção aos outros compartimentos subcelulares (ALCANTARA et al., 2014).

De qualquer parte da membrana da citofaringe, vesículas pinocíticas com 80 nm de diâmetro médio brotam. A endocitose de LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteínas de baixa densidade), de albumina (BSA – *bovine serum albumin*) e transferrina, conjugados a ouro coloidal, permitiu que os pesquisadores observassem tanto a abertura do citóstoma quanto à citofaringe preenchidos com ouro coloidal, revelando a morfologia e a profundidade desse túnel (SOARES; DE SOUZA, 1991; PORTO-CARREIRO et al., 2000; ALCANTARA et al., 2014).

Até o momento, as vesículas que brotam da citofaringe não foram observadas contendo revestimento proteico. Nos mamíferos, a endocitose mediada por receptores, como é o caso da LDL e da transferrina ocorre em vesículas revestidas por clatrina. A presença de clatrina em vesículas em epimastigotas de *T. cruzi* foi mostrada por ensaios *in silico*, de reação cruzada pelo uso de anticorpos anti-clatrina bovina por microscopia de fluorescência (CORREA et al., 2007) e mais recentemente por técnicas de biologia molecular (KALB et al., 2014). Ambos os trabalhos mostraram que a clatrina está envolvida no tráfego de vesículas a partir do complexo de Golgi e da bolsa flagelar.

O complexo citóstoma-citofaringe é dinâmico e sua presença é modulada durante eventos de divisão e diferenciação celular. Durante a divisão dos epimastigotas, o complexo citóstoma-citofaringe é desmontado ao final de G2 e montado *de novo* em cada célula filha durante a citocinese (ALCANTARA et al., 2017). Os epimastigotas nestes estágios do ciclo celular não são capazes de endocitar.

Durante a metaciclogênese, o complexo citóstoma-citofaringe é gradativamente desmontado de acordo com o deslocamento da tríade flagelo - bolsa flagelar –cinetoplasto. Essas três estruturas migram, em conjunto, para região posterior da célula (VIDAL et al., 2016). A ausência do complexo citóstoma-citofaringe em tripomastigotas explica a incapacidade de endocitose por essas formas.

## 2.2.2 Degradação e estocagem de macromoléculas – o papel dos reservossomos.

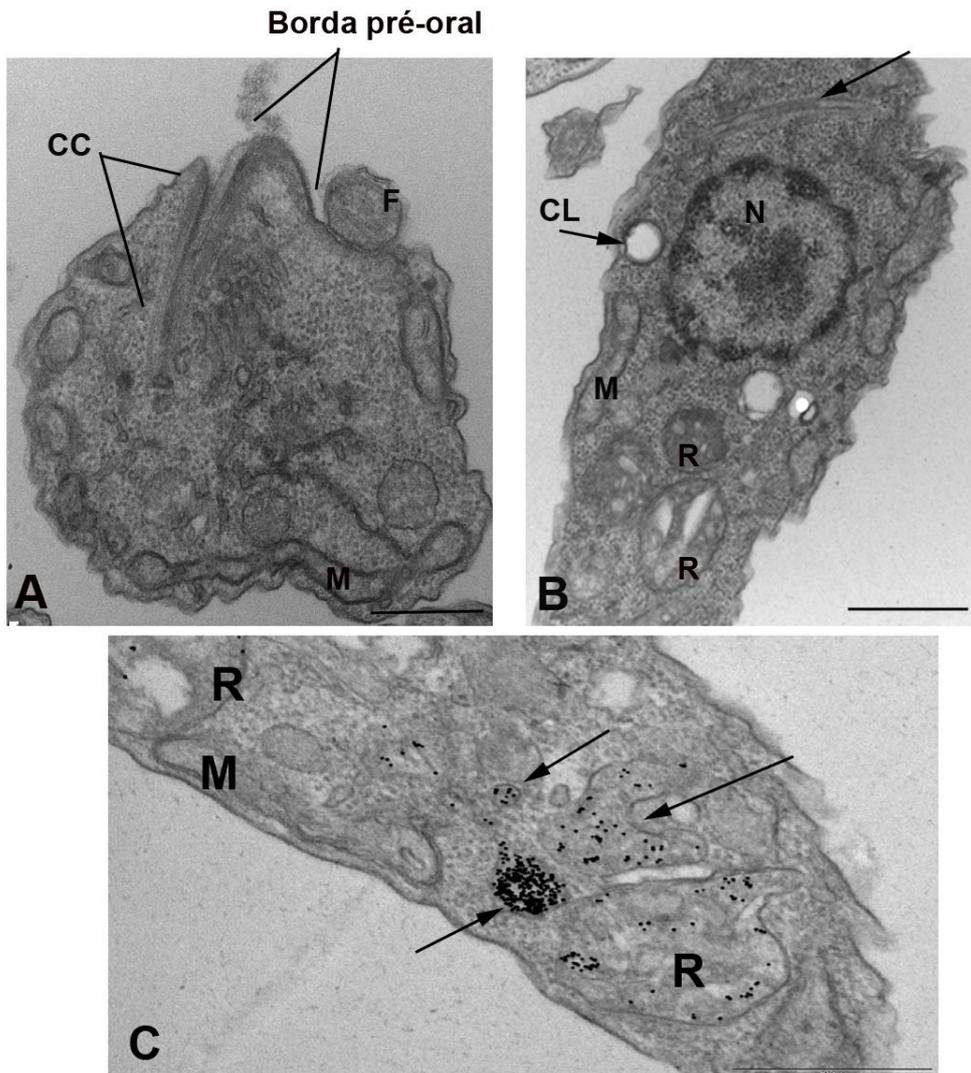
Do complexo citóstoma – citofaringe, vesículas brotam contendo a carga endocitada e se fundem a uma rede túbulo-vesicular que se distribui da citofaringe até a região posterior da célula. Dados morfológicos, ensaios de cinética de endocitose e a determinação do pH ácido sugerem que estes compartimentos integrem os endossomas iniciais neste modelo. A partir dos endossomas iniciais, vesículas menores contendo o material endocitado brotam e se fundem aos reservossomos. Alternativamente, também foi observado que contatos diretos e transientes entre as membranas dos endossomas e reservossomos são responsáveis pela entrega de material endocitado para estas organelas (PORTO-CARREIRO et al., 2000; ALCANTARA; DE SOUZA; CUNHA E SILVA, 2018).

Os reservossomos estão presentes, principalmente, na região posterior dos epimastigotas, no lado oposto a bolsa flagelar e à saída do flagelo, e pertencem ao grupo de organelas semelhantes aos lisossomos (LLO – do inglês: *lysosome like organelles*), participando da digestão e reciclagem de macromoléculas (Figura 2C).

Este conjunto de organelas foram assim designados primordialmente [reserva + soma (corpo)] por acumularem materiais proteico e lipídico que seriam úteis durante o fenômeno de metaciclogênese (SOARES; DE SOUZA, 1988). Contudo, atualmente os parasitologistas preferem designar os reservossomos como organelas semelhantes aos lisossomos (VIDAL et al., 2017).

São compartimentos envoltos por uma unidade de membrana, apresentando, em média 400 a 700 nm de diâmetro. Além disso, contêm vesículas e perfis de membrana no lúmen, além de inclusões lipídicas de colesterol ou ésteres de colesterol. A alta taxa de endocitose de lipoproteínas do soro contribui para a formação de inclusões lipídicas com formato cristalóide em decorrência do excesso de colesterol captado (SANT'ANNA et al., 2008; PEREIRA et al., 2011).

Ademais, não apresentam marcadores moleculares descritos para lisossomos, como Igp 120, LAMP 1 ou LAMP 2, fosfatase ácida (SOARES; SOUTO-PADRON; DE SOUZA, 1992). Por outro lado, apresentam diversas proteases, como a cruzipaína (cisteína protease da classe das calpaínas), serinacarboxipeptidase, lipases,  $\alpha$ -manosídeses, além de proteínas associadas a eventos de sinalização como a tirosina-fosfatase farsenilada, proteínas-cinase serina/treonina (CAZZULO et al., 1990; SOUTO-PADRON et al., 1990; PARUSSINI et al., 2003; CUEVAS et al., 2005; SANT'ANNA et al., 2009).



**Figura 2:** Epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após o processamento para microscopia eletrônica de transmissão.

(A) Corte oblíquo do parasito mostrando parte da borda pré-oral e o complexo citóstoma-citofarínge (CC) formado a partir da membrana plasmática e se aprofundando para o interior celular. (B) O complexo citóstoma-citofarínge pode ser visto longitudinalmente (seta preta), na região anterior. Os corpos lipídicos (CLs) estão presentes em toda extensão do corpo. (C) Região posterior do epimastigota onde endossomos e vesículas carreadoras (setas) estão preenchidas com partículas de LDL acopladas a ouro coloidal. Parte da carga já se encontra no lúmen dos reservossomos (R). M – mitocôndria, N - núcleo. Barra: 500 nm.

O tráfego de cruzipaina a partir do complexo de Golgi não está completamente estabelecido. O fato de não apresentar resíduos de manose fosforilados sugere que o endereçamento da proteína não ocorre através de um receptor para manose-6-fosfato (M6P). A cruzipaina é sintetizada contendo um pró-domínio suscetível à clivagem. A clivagem é necessária para o correto endereçamento até os reservossomos, levando à formação de um pró-peptídeo que atua como inibidor da enzima madura. A ação da cruzipaina é também modulada pela presença de uma pequena proteína de 12 kDa – a

chagasina (ENGEL et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; SANTOS et al., 2005; REIS et al., 2007). De forma geral, o endereçamento das enzimas em direção aos compartimentos endossomais em epimastigotas de *T. cruzi* não está definido.

Em se tratando de uma organela da via endocítica, o lúmen é acidificado por uma H<sup>+</sup>-ATPase do tipo P e o pH estimado é 6,0. Duas isoformas desta bomba de prótons foram identificadas no *T. cruzi*: TcHA1 e TcHA2. A primeira apresenta localização na membrana plasmática, citóstoma e vesículas endossomais, além de reservossomos, enquanto que a TcHA2 tem localização apenas nos reservossomos (VIEIRA et al., 2005).

A presença dessa classe de ATPase em uma organela da via endocítica é incomum, pois nos compartimentos endocíticos de outros modelos celulares, como mamíferos, encontram-se ATPases do tipo V (vacuolar) (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006). A ATPase do tipo P (protoplasmática) foi descrita na membrana plasmática de plantas e fungos (KUHLEBRANDT, 2004).

A composição dos reservossomos é bastante heterogênea. A análise proteômica revelou a presença de enzimas associadas à biossíntese de ergosterol, HMG-CoA redutase (Hidroximetil glutaril Coenzima A redutase), embora não haja qualquer indício de síntese nos reservossomos (SANT'ANNA et al., 2009). A identificação de enzimas tão heterogêneas em organelas da via endocítica pode ser consequência do tráfego para posterior digestão por proteases.

No citosol dos epimastigotas, observam-se também vesículas contendo arilsulfatase, uma enzima descrita em lisossomos de células de mamíferos (ADADE; DE CASTRO; SOARES, 2007). A sua relação com a via endocítica do parasito permanece indeterminada. O tráfego a partir dos endossomos iniciais e dos reservossomos em direção à membrana plasmática ou para os demais compartimentos celulares é pouco conhecido. Além disso, não há dados na literatura sobre a reciclagem de receptores ou mesmo sobre o processo de digestão da maior parte do conteúdo luminal. O fenômeno de endocitose, apesar de essencial para os epimastigotas, está longe de ser inteiramente conhecido.

## 2.3 TRÁFEGO INTRACELULAR DE FERRO E COLESTEROL

Ainda que os dados sobre os reservossomos e sobre o tráfego endocítico sejam escassos, outros dados da literatura apontam a relevância desses compartimentos para a proliferação e durante o estresse nutricional que antecede a metaciclogênese.

A captação de íons ferro, por exemplo, é essencial para o metabolismo e sobrevivência de *T. cruzi*. A aquisição dos íons nos epimastigotas ocorre tanto pela captação de heme quanto por transportadores. A captação de heme já foi mostrada por transportadores do tipo ABC (do inglês ATP Binding Cassete) em epimastigotas (LARA et al., 2007) e pela presença de um transportador localizado na membrana da bolsa flagelar (TcHTE). O mecanismo de ação do transportador TcHTE não está esclarecido, mas é fato que aumenta ou atua no tráfego de heme pela membrana (MERLI et al., 2016).

Os tripanossomatídeos são auxotróficos para heme e as formas epimastigotas de *T. cruzi* dependem de heme para a proliferação. O grupo porfirínico atua mediante a sinalização do estado redox no parasito, havendo produção de espécies reativas de oxigênio (NOGUEIRA et al., 2011).

No inseto vetor, a aquisição de íons ferro também ocorre por endocitose de transferrina. O receptor de transferrina em epimastigotas e amastigotas não está caracterizado. Por outro lado, Brosnon e colaboradores (2016) mostraram que a endocitose de transferrina ocorre mediante a interação com lectinas de 375 kDa semelhantes topologicamente à superfamília de receptores de lectinas de mamíferos.

Durante o estresse nutricional, Tonelli e colaboradores (2011) mostraram que a fosforilação da eIF2 $\alpha$  é necessária para desencadear a metaciclogênese. A eIF2 $\alpha$  é um fator de início de tradução em eucariotos superiores, sendo formada por três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e é ativada sob condições de estresse, sendo fosforilada por uma serina treonina cinase. Em mamíferos, há quatro tipos de serina treonina cinases, uma delas sensível à concentração de heme. Em *T. cruzi*, a eIF2 $\alpha$  cinase (TcK2) está localizada nos reservossomos e é regulada pela concentração de heme. No reto dos triatomíneos, onde a metaciclogênese ocorre, a disponibilidade de heme é escassa e desencadeia a autofosforilação de TcK2, ativando-a. Quando os níveis de heme estão baixos e a TcK2 se torna ativa, ocorre parada da síntese proteica e inicia-se a metaciclogênese (DA SILVA AUGUSTO et al., 2015). Em contrapartida, quando os níveis estão altos, logo após o repasto sanguíneo, o heme captado sai dos reservossomos e é estocado no citosol, contribuindo para a proliferação dos epimastigotas (LARA et al., 2007).

Além do ferro, tanto *T. cruzi* como outros tripanossomatídeos dependem de fontes de esteróis exógenos. *T. cruzi* adquire lipídios oriundos do hospedeiro mamífero ou inseto vetor a fim de executar tarefas indispensáveis em todas as formas de desenvolvimento. As formas epimastigota e tripomastigota apresentam variações na composição de fosfolipídios e no perfil de lipídios neutros de acordo com a idade da cultura ou a temperatura de

crescimento (BRONIA; AGUERRI; BERTETTO, 1986; FLORIN-CHRISTENSEN et al., 1997). Já os amastigotas apresentam altas quantidades de colesterol e uma baixa concentração de ergosterol, que constitui o principal lipídio neutro nos epimastigotas provenientes de cultura *in vitro* ou do inseto vetor (BRONIA; AGUERRI; BERTETTO, 1986; ISOLA; LAMMEL; GONZALEZ CAPPA, 1986; LIENDO et al., 1999). Esses trabalhos mostram claramente que os parasitos têm a habilidade de modular sua composição lipídica de acordo com o meio e as necessidades celulares. Entretanto, enquanto o receptor de LDL já foi caracterizado em *T. brucei rhodesiense* (doença do sono na África Oriental, incluindo Moçambique), *T. vivax* (doença do sono em gado, equinos e ovinos), *L. donovani* (leishmaniose visceral no Velho Mundo) como uma proteína de 145 kDa (BASTIN et al., 1996), em *T. cruzi* pouco é sabido acerca do tráfego de lipídios neutros.

O colesterol adquirido por endocitose de LDL é distribuído para a membrana plasmática ou é estocado na forma de ésteres de colesterol em corpos lipídicos. A esterificação mediante a ação de uma enzima semelhante à ACAT (acil-CoA: colesterol aciltransferase) sensível ao avasimibe (PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2018)

O mecanismo de saída do colesterol dos reservossomos não está elucidado. Provavelmente, deve ocorrer à semelhança do que ocorre em mamíferos, pela presença de proteínas no lúmen e na membrana lisossomal que transferem o colesterol para a membrana do retículo endoplasmático mediante o estabelecimento de sítios de contato (RAIBORG; WENZEL; STENMARK, 2015). Os epimastigotas de *T. cruzi* expressam Rab18 e está localizada nos corpos lipídicos (PEREIRA et al., 2018). A Rab18 está envolvida na aposição do retículo endoplasmático em torno dos corpos lipídicos, permitindo, assim, a disponibilização das reservas para suprir a demanda da célula, como por exemplo, a síntese de membrana ou sob estresse nutricional (KHOR, SHEN, KRAEMER; 2013).

Em epimastigotas mantidos em meio com privação de lipídios, as reservas presentes nos reservossomos são mobilizadas mais rapidamente do que as estocadas nos corpos lipídicos. Por outro lado, os epimastigotas mantidos sob controle, com disponibilidade de nutrientes, estocam o colesterol captado nos corpos lipídicos (PEREIRA et al., 2015).

Os corpos lipídicos de epimastigotas mantidos em cultivo axênico apresentam grandes quantidades de ésteres de colesterol, perfazendo quase 90% de seu conteúdo. O restante é constituído de colesterol livre, triacilglicerol e outros lipídios neutros (PEREIRA et al., 2018).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os aspectos celulares das formas epimastigotas de *T. cruzi*, assim como das demais formas de desenvolvimento, carecem de aprofundamento. Nas duas últimas décadas houve um avanço considerável relativo à compreensão dos fenômenos celulares que regem a captação de nutrientes, o metabolismo do parasito, a transcrição e expressão de (glico) proteínas endógenas ou de superfície que norteiam o processo de infecção tanto nos triatomíneos quanto nos mamíferos.

O avanço das técnicas moleculares tem proporcionado dados imprescindíveis aos pesquisadores de forma a elucidar eventos associados à evolução do parasitismo, às diferenças de virulência entre as cepas, assim como sua distribuição no continente americano. Similarmente, tem permitido modular a expressão de genes e avaliar o papel de diversas proteínas na fisiologia parasitária.

A identificação de proteínas ou enzimas cruciais para a sobrevivência do parasito pode se tornar um alvo estratégico para a quimioterapia antiparasitária ou para a modulação do estabelecimento e colonização no inseto vetor, proporcionando alternativas para o controle da transmissão vetorial.

### 4. REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; DE CASTRO, S. L.; SOARES, M. J. Ultrastructural localization of *Trypanosoma cruzi* lysosomes by aryl sulphatase cytochemistry. **Micron**, v. 38, n. 3, p. 252-256, 2007.

AMORIM, J. C.; BATISTA, M.; DA CUNHA, E. S.; LUCENA, A. C. R. *et al.* Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9899, 2017.

ALCANTARA, C. L.; DE SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N. L. Tridimensional electron microscopy analysis of the early endosomes and endocytic traffic in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Protist**, v.169, n.6, p.887-910, 2018.

ALCANTARA, C. L.; VIDAL, J. C.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. L. The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J Cell Sci**, v. 127, p. 2227-2237, 2014.

ALCANTARA, C. L.; VIDAL, J. C.; DE SOUZA, W.; CUNHA, E. S. N. L. The cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes disassembles during cell division. **J Cell Sci**, v.130, p. 164-176, 2017.

ANGELOPOULOS, E. Pellicular microtubules in the family Trypanosomatidae. **J Protozool**, v.17, n. 1, p. 39-51, 1970.

ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B. et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v.309, n. 5733, p. 473-476, 2005.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Front Immunol**, v.4, p.186, 2013.

BASTIN, P.; STEPHAN, A.; RAPER, J.; SAINT-REMY, J. M. et al. An M(r) 145,000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. **Mol Biochem Parasitol**, v.76, n. 1-2, p. 43-56, 1996.

BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **J Exp Biol**, v.209, n. 4, p. 577-589, 2006.

BRONIA, D. H.; AGUERRI, A. M.; BERTETTO, S. T. *Trypanosoma cruzi*: changes in lipid composition during aging in culture. **Exp Parasitol**, v.61, n. 2, p. 151-159, 1986.

BROSSON, S.; FONTAINE, F.; VERMEERSCH, M.; PEREZ-MORGA, D. PAYS, E; BOUSBATA, S; SALMON, D. Specific Endocytosis Blockade of *Trypanosoma cruzi* Exposed to a Poly-LAcNAc Binding Lectin Suggests that Lectin-Sugar Interactions Participate to Receptor-Mediated Endocytosis. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163302, 2016.

BRUCE, D. Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand. **Durban: Bennett and Davis**, 1895.

CAZZULO, J. J.; HELLMAN, U.; COUSO, R.; PARODI, A. J. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. **Mol Biochem Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 41-48, 1990.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CORREA, J. R.; ATELLA, G. C.; MENNA-BARRETO, R. S.; SOARES, M. J. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. **J Eukaryot Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 297-302, 2007.

COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed, Guanabara Koogan, 2015.

CUEVAS, I. C.; ROHLOFF, P.; SANCHEZ, D. O.; DOCAMPO, R. Characterization of farnesylated protein tyrosine phosphatase TcPRL-1 from *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 9, p. 1550-1561, 2005.

DA SILVA AUGUSTO, L.; MORETTI, N. S.; RAMOS, T. C.; DE JESUS, T. C.; ZHANG, M; CASTILHO, B. A; SCHENKMAN, S. A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in

endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004618, 2015.

DE JESUS, A. R.; COOPER, R.; ESPINOSA, M.; GOMES, J. E.; GARCIA E. S.; PAUL, S.; CROSS, G. A. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. **J Cell Sci**, v. 106, n. 4, p. 1023-1033, 1993.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v.8, n.4, p.269-285, 2002.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem**, v. 44, n. 2, p. 67-124, 2009.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; PALMER, J.; HSIEH, I. *et al.* Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci**, v.111, n.5, p.597-606, 1998.

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; DE ISOLA, E. D.; LAMMEL, E.; MEINARDI, E.; BRENNER, R.R; *et al.* Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. **Mol Biochem Parasitol**, v. 88, n. 1-2, p. 25-33, 1997.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp Parasitol**, v. 66, n. 2, p.205-212, 1988.

GREEN, H. P.; DEL PILAR MOLINA PORTELA, M.; ST JEAN, E. N.; LUGLI, E. B. *et al.* Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n.1, p. 422-427, 2003.

HAMED, A.; BOTELHO, L.; BRITTO, C.; FRAGOSO, S. P; UMAKI, A. C; GOLDENBERG, S; BOTTU, G; SALMON, D. *In vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. **Mol Biochem Parasitol**, v. 200, n.1-2, p. 9-18, 2015.

ISOLA, E. L.; LAMMEL, E. M.; GONZALEZ CAPP, S. M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. **Exp Parasitol**, v. 62, n. 3, p. 329-335, 1986.

JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. **Res Microbiol**, v.165, n. 3, p. 155-165, 2014.

KALB, L. C.; FREDERICO, Y. C.; BATISTA, C. M.; EGER, I. FRAGOSO, S. P; SOARES, M. J. Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Cell Biol**, v.15, p. 23, 2014.

KHOR, V. K.; SHEN, W. J.; KRAEMER, F. B. Lipid droplet metabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.16, n. 6, p. 632-637, 2013.

KUHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5, n. 4, p. 282-295, 2004.

LANDER, N.; LI, Z. H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **MBio**, v.6, n. 4, p. e01012, 2015.

LARA, F. A.; SANT'ANNA, C.; LEMOS, D.; LARANJA, G. A.; COELHO, M. G.; REIS SALLES, I.; MICHEL, A; et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.355, n. 1, p. 16-22, 2007.

LIENDO, A.; VISBAL, G.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; URBINA, J. A. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.104, n. 1, p. 81-91, 1999.

LUKES, J.; SKALICKY, T.; TYC, J.; VOTYPKA, J.; YURCHENKO, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, v.195, n. 2, p. 115-122, 2014.

MERLI, M. L.; PAGURA, L.; HERNANDEZ, J.; BARISON, M. J.; PRAL, E. M.; SILBER, A. M.; CRICCO, J. A. The *Trypanosoma cruzi* Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n. 1, p. e0004359, 2016.

MILDER, R.; DEANE, M. P. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. **J Protozool**, v.16, n. 4, p. 730-737, 1969.

MINNING, T. A.; WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J., 3rd; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 370, 2009.

MONTEIRO, A. C.; ABRAHAMSON, M.; LIMA, A. P.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SCHARFSTEIN, J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci**, v.114, n. Pt 21, p.3933-3942, 2001.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, n. Pt 5, p. 1861-1875, 2004.

NOGUEIRA, N. P.; DE SOUZA, C. F.; SARAIVA, F. M.; SULTANO, P. E.; DALMAU, S. R.; BRUNO, R. E; et al. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. **PLoS One**, v.6, n. 10, p. e25935, 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))> acesso em 25/04/2020

PARUSSINI, F.; GARCIA, M.; MUCCI, J.; AGUERO, F.; SANCHEZ, D.; HELLMAN, U.; ASLUND, L.; CAZZULO, J. J. Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.131, n. 1, p. 11-23, 2003.

PEREIRA, M. G.; NAKAYASU, E. S.; SANT'ANNA, C.; DE CICCIO, N. N.; ATELLA, G. C.; DE SOUZA, W.; et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. **PLoS One**, v.6, n. 7, p. e22359, 2011.

PEREIRA, M. G.; VISBAL, G.; SALGADO, L. T.; VIDAL, J. C.; GODINHO, J. L.; DE CICCIO, N. N.; et al. *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. **PLoS One**, v.10, n. 6, p. e0128949, 2015.

PEREIRA, M. G.; VISBAL, G.; COSTA, T. F. R.; FRASES, S.; DE SOUZA, W.; ATELLA, G.; CUNHA, E. SILVA N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes store cholesteryl esters in lipid droplets after cholesterol endocytosis. **Mol Biochem Parasitol**, v.224, p. 6-16, 2018.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet*, v.391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **Eur J Cell Biol**, v.79, n. 11, p. 858-869, 2000.

RAIBORG, C.; WENZEL, E. M.; STENMARK, H. ER-endosome contact sites: molecular compositions and functions. **EMBO J**, v.34, n. 14, p. 1848-1858, 2015.

RANGEL-ALDAO, R.; ALLENDE, O.; TRIANA, F.; PIRAS, R.; HENRIQUEZ, D.; PIRAS, M. Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.22, n. 1, p. 39-43, 1987.

RANGEL-ALDAO, R.; TRIANA, F.; FERNANDEZ, V.; COMACH, G.; ABATE, T.; MONTOREANO, R. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Int**, v. 17, n. 2, p. 337-344, 1988.

REIS, F. C.; COSTA, T. F.; SULEA, T.; MEZZETTI, A.; SCHARFSTEIN, J.; BROMME, D.; MENARD, R.; LIMA, A. P. The propeptide of cruzipain--a potent selective inhibitor of the trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. **FEBS J**, v.274, n. 5, p. 1224-1234, 2007.

ROCHA, G. M.; SEABRA, S. H.; DE MIRANDA, K. R.; CUNHA-E-SILVA, N.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Attachment of flagellum to the cell body is important to the kinetics of transferrin uptake by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, v.59, n. 4, p. 629-633, 2010.

SANT'ANNA, C.; NAKAYASU, E. S.; PEREIRA, M. G.; LOURENCO, D.; DE SOUZA, W.; ALMEIDA, I. C.; CUNHA, E. SILVA N. L. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v.9, n. 7, p. 1782-1794, 2009.

- SANT'ANNA, C.; PEREIRA, M. G.; LEMGRUBER, L.; DE SOUZA, W.; CUNHA E SILVA, N. L. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microsc Res Tech**, v.71, n. 8, p. 599-605, 2008.
- SANTOS, C. C.; SANT'ANNA, C.; TERRES, A.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA A. P. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. **J Cell Sci**, v.118, n. Pt 5, p. 901-915, 2005.
- SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol**, v.22, n. 4, p. 168-174, 2006.
- SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v.20, n. 2, p. 349-361, 1988.
- SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v.77, n. 6, p. 461-468, 1991.
- SOARES, M. J.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci**, v.102, n.1, p. 157-167, 1992.
- SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J. J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J Cell Sci**, v.96, n.3, p. 485-490, 1990.
- TONELLI, R. R.; AUGUSTO LDA, S.; CASTILHO, B. A.; SCHENKMAN, S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. **PLoS One**, v.6, n. 11, p. e27904, 2011.
- VIDAL, J. C.; ALCANTARA, C. L.; DE SOUZA, W.; CUNHA, E. S. N. L. Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J Struct Biol**, v.196, n. 3, p. 319-328, 2016.
- VIDAL, J. C.; ALCANTARA, C. L.; W, D. E. S.; CUNHA, E. S. N. L. Lysosome-like compartments of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes may originate directly from epimastigote reservosomes. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 841-850, 2017.
- VIEIRA, M.; ROHLOFF, P.; LUO, S.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; DE SOUZA, W.; DOCAMPO, R. Role for a P-type H<sup>+</sup>-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v.392, n.3, p. 467-474, 2005.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.7, n. 2, p. 157-163, 2009.
- ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, v.12, n. 2, p. 240-253, 2012.

## HISTONAS EM *Trypanosoma cruzi*: SUAS VARIANTES E MODIFICAÇÕES AO LONGO DO CICLO DE VIDA

Juliana Nunes Rosón<sup>1,2</sup>, Héllida Marina Costa Silva<sup>1</sup>, Júlia Pinheiro Chagas da Cunha<sup>1</sup>

1. Instituto Butantan, Laboratório de Ciclo Celular, São Paulo, SP, Brasil;

2. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, São Paulo, SP, Brasil.

### RESUMO

Histonas são proteínas básicas que empacotam o DNA e interagem com outras proteínas na cromatina. Elementos epigenéticos, como modificações pós-traducionais (MPTs) de histonas e a incorporação de histonas variantes, podem alterar interações proteína-proteína e proteína-DNA, alterando a compactação da cromatina e podendo regular a expressão gênica. As histonas de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, são divergentes comparadas a outros organismos. Nos tripanossomatídeos, histonas variantes têm sido descritas, tais como, a TcH3V e TcH2A.Z, associadas a regulação de transcrição do DNA; e a TcH2BV que além de estar enriquecida em sítios de início de transcrição, pode estar envolvida na regulação do processo de metaciclogênese e de infecção celular de *T. cruzi*. Conjuntamente, as primeiras MPTs de histonas de *T. cruzi* descritas foram identificadas por espectrometria de massas, como fosforilações, metilações e acetilações em resíduos específicos das histonas H1 e H4. Subseqüentemente, estudos associaram certas MPTs a regiões de início e término de transcrição, a progressão do ciclo celular e ao reparo de DNA. Por proteômica quantitativa, permitiram a detecção e quantificação de MPTs de histonas exclusivas ou enriquecidas em cada forma de vida do parasito, como a acetilações na região C-terminal da H2A de tripomastigotas metacíclicos. Em seguida, mais de 100 MPTs foram identificadas nas histonas das formas epimastigotas. Nosso grupo recentemente padronizou protocolo para quantificar MPTs de histonas, aumentou a detecção e quantificação de sítios modificados e facilitou a dinâmica de investigação das MPTs de histona em tripanossomatídeos. Atualmente, procuramos padronizar a técnica de CRISPR-dCas9, gerando parasitas com a dCas9 constitutiva, melhorando a identificação de proteínas e de MPTs de histonas em *locus* específicos deste genoma.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Histonas e Epigenética.

### ABSTRACT

Histones are basic proteins which package DNA and interact with other proteins in chromatin. Epigenetic elements, such as post-translational modifications (PTMs) of histones and incorporation of histone variants, can alter protein-protein and protein-DNA interactions, altering chromatin compaction and being able to regulate gene expression. The histones of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, are divergent compared to

other organisms. In Trypanosomatids, histone variants have been described, such as TcH3V and TcH2A.Z, associated with the regulation of DNA transcription; and TcH2BV, which in addition to be enriched in transcription start sites, may be involved in regulating the process of metacyclogenesis and cell infection in *T. cruzi*. Jointly, the first *T. cruzi* histone PTMs described were identified by mass spectrometry, such as phosphorylation, methylation and acetylation in specific residues of H1 and H4 histones. Subsequently, studies have associated certain PTMs with transcription start and terminal sites, cell cycle progression and DNA repair. By quantitative proteomics, allowed the detection of PTMs of exclusive or enriched histones in each life form of the parasite, such as acetylations in the C-terminal region of H2A of metacyclic trypomastigotes. In addition, more than 100 PTM sites were detected in epimastigote forms. Our group recently standardized a protocol to quantify histone PTMs, increased the detection of modified sites and facilitated the investigation dynamics of histone PTMs in trypanosomatids. Currently, we aim to standardize the CRISPR-dCas9 technique, generating parasites with the constitutive dCas9, improving the identification of histone proteins and PTMs in specific loci of this genome.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Histones and Epigenetics.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTONAS DE EUCARIOTOS

O DNA eucariótico é enovelado e armazenado no interior do núcleo celular. O processo de empacotamento do DNA é responsável pela proteção do DNA, pelo controle do acesso molecular e também pela modulação de funções como a expressão gênica, o reparo e as alterações epigenéticas (ALBERTS et al., 2002; LUGER et al., 1997; OLINS; OLINS, 2003).

A cromatina, composta pela molécula de DNA e por proteínas, apresenta níveis de organização estrutural que permitem a compactação do DNA no interior do núcleo celular. O primeiro nível de organização estrutural da cromatina são os nucleossomos, que são estruturas formadas por 1,65 volta de DNA, nas quais 147 pb de DNA é enovelado em um octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4. Cada octâmero contém duas cópias do dímero H2A-H2B e duas cópias do dímero H3-H4. Entre um octâmero e outro há uma porção de 10-90 pb de DNA livre, chamada de DNA *linker*, que está associada com a histona H1, conhecida como histona de ligação (MALIK; HENIKOFF, 2003; MUYLDERMANS et al., 1981; RICHMOND; DAVEY, 2003). Este primeiro nível de compactação é chamado de “colar de contas” e tem o tamanho de 10 nm. No segundo nível de compactação, as porções N- e C- terminais das histonas interagem e, com o auxílio da histona H1, é formado a fibra

de 30 nm de espessura. No terceiro nível de compactação ocorre interação entre as fibras formando uma estrutura de 250 a 700 nm. A partir deste ponto, há interação de cromátides para a integração de um cromossomo de 1400 nm de espessura (LI; ZHU, 2015; ZLATANOVA; LEUBA; VAN HOLDE, 1999).

Dentre as proteínas associadas à cromatina, as histonas representam 50% do total da cromatina, tendo caráter básico e sendo altamente conservadas entre as espécies (VAN HOLDE; SAHASRABUDDHE; SHAW, 1974). Tanto histonas canônicas (mais abundantes e comumente incorporadas na fase S do ciclo celular) quanto as variantes (diferem das canônicas na sequência primária, são menos abundantes e podem ser incorporadas em qualquer fase do ciclo celular) possuem domínio central globular e regiões flexíveis que compreendem as porções N- e C-terminais, com cerca de  $123 \pm 14$  aminoácidos, massa molecular igual  $13,5 \pm 1,5$  kDa e ponto isoelétrico de  $11 \pm 0,5$  (ALBIG et al., 1997; MARZLUFF; DURONIO, 2002; VENKATESH; WORKMAN, 2015).

Sabe-se que o tetrâmero H3-H4 forma um núcleo mais estável que H2A-H2B. Dessa forma, H2A-H2B apresenta uma maior capacidade de remodelamento, sendo removida primeiro que H3-H4, quando se faz necessário remodelar a cromatina (LUGER; DECHASSA; TREMETHICK, 2012).

As histonas H3 e H4 são mais conservadas que H2A e H2B, principalmente devido à interação da H4 com todas as histonas presentes no octâmero. Por esta razão, as variantes das histonas H2A e H2B são mais divergentes do que as variantes de H3 e H4 (KHORASANIZADEH, 2004; MALIK; HENIKOFF, 2003). A histona H1 é a mais divergente entre espécies, possuindo muitos resíduos de lisina, tornando a molécula capaz de interagir com o DNA mais facilmente (IZZO; KAMIENIARZ; SCHNEIDER, 2008).

## 1.2. PAPEL DAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS E DAS VARIANTES DE HISTONAS

Assim como a metilação de bases nitrogenadas no DNA, as modificações pós-traducionais (MPTs) em histonas e a substituição de histonas canônicas por histonas variantes são capazes de regular a estrutura da cromatina. Estas ocorrências podem modificar as propriedades físico-químicas dos nucleossomos, causando alterações nas interações proteína-proteína e compactação da cromatina a nível superior, o que pode regular a replicação do DNA, a transcrição e outras funções moleculares (BERNSTEIN;

MEISSNER; LANDER, 2007; TALBERT; HENIKOFF, 2010; WADDINGTON, 2012; WATSON, 2003).

Acetilações, metilações e fosforilações, geralmente, ocorrem nas porções N- e C-terminais das histonas, pois estas regiões são mais expostas na proteína. Tais modificações alteram a interação com DNA, histonas e outras proteínas, interferindo na compactação da cromatina. Além disso, as MPTs podem modificar sítios de ligação de fatores envolvidos em processo celulares, como replicação, reparo ao dano de DNA e expressão gênica. A presença de algumas MPTs foi associada com a cromatina ativa, como por exemplo, a trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3). Já outras caracterizam cromatina repressiva, como a trimetilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9me3) e a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3) (CARLBERG; MOLNÁR, 2018; KOUZARIDES, 2007). Assim, ao longo do tempo, a correlação entre os sítios e as diversas combinações de modificações com os efeitos específicos, tornou possível o estabelecimento do “código de histona” (STRAHL; ALLIS, 2000). Estudos mostram que algumas MPTs podem funcionar em conjunto para estimular ou inibir outros sítios de modificação. Por exemplo, a H3K4 metilada facilita acetilações em H3 K9, K14, K17 e K23 e em H4 K5, K8, K12 e K16. Por outro lado, a H3K9 metilada dificulta as acetilações na H3 K9, K14, K17 e K23 (WANG et al., 2001). Tem sido descrito a associação entre marcas específicas e diversos efeitos celulares, como a malignidade de tumores, a diferenciação de células e sinais inflamatórios de infecções, o que destaca a importância do epigenoma das células (CARLBERG; MOLNÁR, 2018). As modificações são estabelecidas efetivamente pelos *writers*, *readers* e *erasers*, que são enzimas que adicionam, reconhecem e retiram a modificação respectivamente (BISWAS; RAO, 2018).

Outro elemento epigenético importante são as variantes de histonas, que diferem em função e localização das canônicas. Quando incorporadas ao nucleossomo, as histonas variantes podem alterar a afinidade deste ao DNA e a outras proteínas da cromatina, o acesso de moléculas à cromatina, o enovelamento da cromatina e a regulação a susceptibilidade de MPTs (TALBERT; HENIKOFF, 2010; VENKATESH; WORKMAN, 2015).

A variante mais conhecida da histona H1 é a H5, que foi caracterizada em eritrócito aviário (IZZO; KAMIENIARZ; SCHNEIDER, 2008) e apresenta na porção C-terminal um sítio de fosforilação que está relacionado à função de histona de ligação (KOSTOVA et al., 2013).

São encontradas poucas variantes da H4, pois, como já mencionado anteriormente, esta histona é altamente conservada devido ao seu contato com outras histonas no octâmero. Alguns exemplos são: H4-I, H4-II, H4-III e H4-IV em *Gallus galluse* e H4-I e H4-II de *Tetrahymena thermophila* (BANNON et al., 1984; NAKAYAMA et al., 1991).

Para a H3 existem três tipos de variantes principais: foi descrita a CenH3 ou CENP-A, encontrada nos centrômeros, capaz de induzir a formação de *supercoils*, devido à alta capacidade de enovelamento (PALMER et al., 1987); a H3.1 e a H3.2, que possuem apenas um aminoácido de diferença e são estritamente depositadas durante a replicação (HAKE; ALLIS, 2006; TAGAMI et al., 2004); e a H3.3, cuja deposição está associada a descondensação da cromatina antes da primeira replicação do zigoto e ao silenciamento de meiose no cromossomo sexual em mamíferos, revisado em Talbert e Henikoff (2010) e Biterge e Schneider (2014).

As variantes da H2B são poucas e pouco estudadas. A H2B.1 foi identificada em mamífero (DRAIZEN et al., 2016); a H2BT está associada ao ciclo celular e à diferenciação de células germinativas masculinas, auxiliando a passagem do genoma ao óvulo (MONTELLIER et al., 2013); em *Plasmodium falciparum* foi descrito que a H2B.Z atua, dimerizada com H2A.Z, em sítios promotores ricos em AT, regulando a expressão gênica (HOEIJMAKERS et al., 2013).

Para a histona H2A existem quatro variantes principais: H2A.Z, H2A.X, macroH2A e H2ABBD. H2A.Z promove menor estabilidade no nucleossomo e pode formar um heterodímero H2A.Z-H2B e H2A-H2B (SUTO et al., 2000). Esta histona está relacionada à regulação da transcrição, reparo e separação cromossomal e viabilidade da célula. H2A.Z também pode interferir na diferenciação de células tronco e interagir com a H3.3, desestabilizando a cromatina. Adicionalmente, estudos mostraram deposição em regiões promotoras de transcrição bidirecional (ADAM et al., 2001; ALTAF et al., 2009; CREYGHTON et al., 2008; JIN et al., 2009; MENEGHINI; WU; MADHANI, 2003; THAKAR et al., 2009; ZLATANOVA; THAKAR, 2008).

A variante H2A.X é conhecida por atuar durante o dano e o reparo do DNA. Na presença de quebras de duplas fita no DNA, esta histona é fosforilada em sítio específico, tornando-se  $\gamma$ H2A.X, que está envolvida no recrutamento de proteínas de reparo, remodeladoras de cromatina e de enzimas modificadoras de histonas (ALTAF et al., 2009; VAN ATTIKUM; GASSER, 2009). Já a variante macroH2A, específica de vertebrados, é enriquecida no cromossomo X e está relacionada a inibição do gene de pluripotência de fibroblastos em sítios com a presença de H3K27me3 (COSTANZI; PEHRSON, 1998;

GASPAR-MAIA et al., 2013). Por fim, a variante H2ABBD, específica de mamíferos, está relacionada a apoptose, ao desenvolvimento de células germinativas e estabilidade no nucleossomo (GAUTIER et al., 2004; GOSHIMA et al., 2014; MARINO-RAMIREZ et al., 2005).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. AS HISTONAS DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

A cromatina dos tripanossomatídeos, como a de outros eucariotos, tem como unidade básica o nucleossomo. No entanto, durante a mitose não é possível observar a condensação da cromatina e a fibra de 30 nm (BELLI, 2000). Como o genoma da família Trypanosomatidae possui cerca de 30-45 Mb, é necessário que milhões de histonas empacotem todo o DNA. Uma vez que, o núcleo se altera ao longo do ciclo de vida, em *T. cruzi* foi observado que as formas epimastigotas e amastigotas (formas replicativas e não infectivas) possuem núcleo em formato esférico com um grande nucléolo e pequenas quantidades de heterocromatina. Em antemão, as formas tripomastigostas (formas não replicativas e infectivas) contêm núcleo alongado, ausência de nucléolo e a heterocromatina abundante e dispersa no nucleoplasma (ELIAS et al., 2001).

As histonas dos tripanossomatídeos são bem divergentes das histonas de outros organismos, diferindo em tamanho, sequência e carga. De uma forma geral, o domínio globular das histonas destes parasitos é conservado, ao passo que as regiões N- e C-terminais apresentam um maior número de variações. Além disso, os genes de histonas dos tripanossomatídeos podem estar situados em mais de um cromossomo, sendo que a sua transcrição nem sempre é vinculada à replicação do DNA e gera mRNAs poliadenilados, diferente do observado nos demais eucariotos (THATCHER; GOROVSKY, 1994; TORO; GALANTI, 1988, TORO; GALANTI, 1990).

Dados do nosso grupo de pesquisa mostraram alterações epigenéticas, como MPTs de histonas e deposição de variantes de histonas, em *T. cruzi* ao longo do ciclo celular e entre formas de vida diferentes. Em um trabalho, foi verificado que as histonas representam 29% e 5% das proteínas identificadas na cromatina das formas tripomastigota e epimastigota, respectivamente. Tanto a quantidade quanto a diversidade de proteínas

encontradas na cromatina dos tripomastigotas é menor do que a detectada em epimastigotas (JESUS et al., 2017).

## 2.2. AS VARIANTES DE HISTONAS NOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Estudos filogenéticos evidenciaram a existência de histonas variantes específicas de tripanossomatídeos (TALBERT et al., 2012), tais como a histona H3V que encontra-se dimerizada com a H4V em sítios de término de transcrição, nos quais o policístron é flanqueado pela base J ( $\beta$ -D-glicosil-hidroximetiluracila), indicando cromatina inativa (SIEGEL et al., 2009; TALBERT; HENIKOFF, 2010).

Por ortologia, a H2A.Z é encontrada em muitos organismos, inclusive nos da ordem Kinetoplastida. O gene da H2A.Z é essencial tanto em mamíferos quanto nos tripanossomas (TALBERT; HENIKOFF, 2010). Siegel e cols. (2009) propuseram que esta variante esteja envolvida na ativação transcricional, pois sua incorporação torna o nucleossomo mais instável, gerando um impedimento entre nucleossomos e dificultando a compactação. Desta forma, a estrutura da cromatina torna-se mais frouxa, facilitando o acesso da maquinaria de expressão gênica nos sítios em que esta variante está incorporada (ALSFORD; HORN, 2004; SIEGEL et al., 2009). Foi observado por Lowell e cols. (2005) que a H2A.Z dimeriza-se com a H2BV em *T. brucei* e que estes dímeros posteriormente foram localizados enriquecidos em sítios de início de transcrição (LOWELL et al., 2005; SIEGEL et al., 2009).

Como mencionado acima, a presença de quebras de fita dupla no DNA de células de mamíferos promove a fosforilação de um resíduo de serina na variante de histona H2AX. Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, em resposta a danos no DNA, também ocorre a fosforilação de um resíduo de serina conservado presente na histona canônica H2A. A indução de quebras duplas no DNA do *T. brucei* gerou um acúmulo, no sítio de dano de DNA, da histona H2A fosforilada no resíduo de treonina 130. Foi possível identificar esta treonina na cauda C-terminal da histona H2A dos outros tripanossomatídeos, sugerindo que a fosforilação de H2A (chamada de  $\gamma$ H2A) indica a presença de dano no DNA destes parasitos, similar ao observado nos demais eucariotos (GLOVER; HORN, 2012).

Não existem muitos estudos sobre a H2BV. Em tripanossomatídeos, esta variante de histona pertence a um ramo filogenético separado das outras histonas H2B variantes (TALBERT et al., 2012), sendo que, em *T. cruzi*, sua estrutura primária apresenta 46% de

identidade e 74% de similaridade com a H2B canônica. Até o momento, a H2BV foi encontrada enriquecida em nucleossomos contendo H3K4 e K76 trimetilada em *T. brucei* (MANDAVA; JANZEN; CROSS, 2008). Como já visto, os nucleossomos que contém o dímero H2BV-H2A.Z são menos estáveis que nucleossomos canônicos, e consequentemente podem gerar uma cromatina mais “aberta”. Ademais, são nucleossomos mais suscetíveis à iniciação de transcrição, devido ao N-terminal destas variantes possuírem mais sítios de acetilação putativos comparado ao dímero canônico (SIEGEL et al., 2009).

Em nosso grupo de estudo, a H2BV de *T. cruzi* (TcCLB.506779.150) foi detectada em extratos enriquecidos de cromatina das formas epimastigota e tripomastigota. A H2BV estava enriquecida nos tripomastigotas que, como dito acima, é uma forma infectiva e não replicativa, que possui uma cromatina mais compacta (JESUS et al., 2017). Assim, nosso grupo busca explorar a função biológica de H2BV e investigar o seu papel na alteração da cromatina de *T. cruzi*. Até o momento, foi realizada a avaliação fenotípica de heterozigotos nocautes, avaliação dos parceiros de interação e a localização genômica por ensaios de imunoprecipitação da cromatina seguido por sequenciamento (ChIP-seq) de parasitos contendo a H2BV fusionada a um marcador myc (ROSÓN et al., manuscrito em preparação). Os dados sugerem que a menor quantidade desta histona resulta em maiores taxas de diferenciação durante a metaciclogênese (transição de epimastigota para tripomastigotas metacíclicos). Em tal análise, os parasitos foram contados e validados pela forma do núcleo e do cinetoplasto marcados com DAPI. A menor quantidade de H2BV também resulta em maiores taxas de infecção em células de mamíferos LLCMK2 quando comparados com os parasitos selvagens. A análise dos parceiros de interação, por ensaios de *pull-down*, sugere que esta variante interage com proteínas de poro nuclear, proteínas ligadas à transcrição e também com enzimas que reconhecem modificações pós-traducionais, no caso o fator de bromo domínio 2, descrita anteriormente como sendo capaz de reconhecer acetilações de histonas em *T. cruzi* e em outros tripanosomas (VILLANOVA et al., 2009; YANG et al., 2017). Ademais, H2BV está preferencialmente depositada nas regiões genômicas onde se inicia a transcrição, no início do policístron (ROSÓN et al., manuscrito em preparação).

### 2.3. MPT EM HISTONAS DE *T. cruzi*

Em tripanossomas já foram identificadas várias MPTs em histonas. As primeiras identificações, por espectrometria de massas, foram: fosforilação na serina 12 da histona H1 e na histona H4, acetilações nos resíduos K4, K10, K14 e K54, monometilações em K18, e dimetilações em R53 (DA CUNHA et al., 2005, 2006). Ademais, em *T. cruzi* foi observada que a fosforilação de H1 aumenta progressivamente ao longo do ciclo celular, sendo predominantemente encontrada no nucléolo em G1 e S, e quando passa para G2 é fosforilada e se encontra dispersa no núcleo até a mitose (GUTUYAMA; DA CUNHA; SCHENKMAN, 2008).

Nos eucariotos, com exceção dos cinetoplastídeos, algumas MPTs em histonas estão associadas a genes transcricionalmente ativos, como já mencionado no item anterior. Em *T. cruzi*, algumas histonas acetiladas e metiladas, H3ac/H4ac com H3K4me3, encontram-se depositadas nas regiões genômicas localizadas entre policistrons cuja transcrição ocorre em sentidos contrários (regiões divergentes – regiões putativas de início de transcrição) e não entre policistrons cuja transcrição converge no mesmo sentido (regiões putativas de final de transcrição) ou em regiões intergênicas. Desta forma, mostrou-se que as regiões putativas de início e término transcricional de *T. cruzi* são demarcadas por alterações epigenéticas (RESPUELA et al., 2008).

Algumas acetilações, como na H4K10 e na H4K14, encontradas em focos dispersos por todo o núcleo na cromatina densa e não densa, estão associadas à chaperona Asf1, que auxilia na deposição e remoção do dímero de H3 e H4 da cromatina, remodelando-a em resposta a danos no DNA. Estas mesmas acetilações podem ser necessárias para a montagem da cromatina para a replicação e para transcrição dos tripanossomas (PASCOALINO et al., 2014; RAMOS et al., 2015). Adicionalmente, a H4K4ac encontra-se preferencialmente em regiões densas da cromatina, exceto no nucléolo de formas epimastigotas, e não colocalizadas nos principais sítios da RNA polimerase II. Os níveis desta MPT estão diminuídos em formas não replicativas, em comparação à H4K10ac e H4K14ac. Foi observado que as acetilações na H4 têm papéis diferentes em *T. cruzi*: a K4 na cromatina mais compacta de formas proliferativas, já a K10 e K14 distribuem-se entre cromatina compacta e livre. A H4K14ac está fortemente presente na fase G2 e M do ciclo celular, enquanto H4K4ac, H4K10ac e H4K14ac estão acumuladas após a fase S, quando os parasitos são sincronizados na fase G1/S do ciclo celular com hidroxiureia. Após exposição à radiação  $\gamma$ , a heterocromatina desaparece e a H4K4ac diminui, ao passo que

a H4K10ac e H4K14ac aumentam durante o reparo do DNA, sugerindo a importância dessas MPTs no ciclo celular e seu envolvimento no processo de reparo ao dano no DNA (NARDELLI et al., 2009).

Nos últimos anos, mais MPTs em histonas foram analisadas nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* por proteômica quantitativa. Neste estudo foi possível observar MPTs mais específicas e enriquecidas em diferentes formas de vida do parasito. Nos epimastigotas foi detectado que H3K76me1 e a H3K76me2 estão enriquecidas durante mitose, e H3K76me2 também na citocinese. Também foram encontradas MPTs exclusivas de tripomastigotas, como acetilação na região C-terminal da H2A e H3K23me1 (DE JESUS et al., 2016).

Em outro estudo, mais de 100 resíduos com MPTs foram identificados nas histonas de epimastigotas, entre elas são: metilação (mono, di e tri), fosforilação, acetilação, ubiquitinação, propionilação, buirilação, crotonilação, formilação, hidroxilação, citrulinação, malonilação, succinilação, 2-hidroxi-butirilação, glutarilação, sumoilação, O-GlcNacilação, ADP-ribosilação e prolina isomerização (PICCHI et al., 2017).

Estudos têm sido realizados para identificar as enzimas que promovem mudanças epigenéticas nos tripanossomatídeos. Já foram descritas as acetiltransferases HAT1 e HAT2, que são essenciais para a diferenciação da forma sanguínea de *T. brucei*. Foi visto que a HAT2 acetila H4K10 e a HAT3 acetila H4K4 (KAWAHARA et al., 2008; SIEGEL et al., 2008). As desacetilases, DAC1 e DAC3, são essenciais, e a DAC4 é importante para progressão do ciclo celular em *T. brucei* (INGRAM; HORN, 2002). Similar aos complexos *readers*, como o cromo domínio, SANT domínio e bromo domínio, que se ligam e reconhecem as MPTs, a proteína fator de bromo domínio 2 de *T. cruzi* (TcBDF2) associa-se à H2A e H4 acetilada (principalmente nos resíduos K10 e K14) e acumula-se nas formas epimastigotas após exposição à luz ultravioleta (IVENS et al., 2005; VILLANOVA et al., 2009). Em *T. brucei* foi identificada a bromo domínio 3 (BDF3) em regiões que se iniciam a transcrição (SIEGEL et al., 2009).

#### 2.4. MPTS DE HISTONAS: NOVAS ABORDAGENS

Para melhor compreender o papel dos mecanismos epigenéticos na biologia do *T. cruzi* se faz necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam, de forma acessível e acurada, a detecção e identificação das diversas modificações de histonas presentes neste eucarioto. Neste sentido, recentemente, foi padronizado um protocolo para

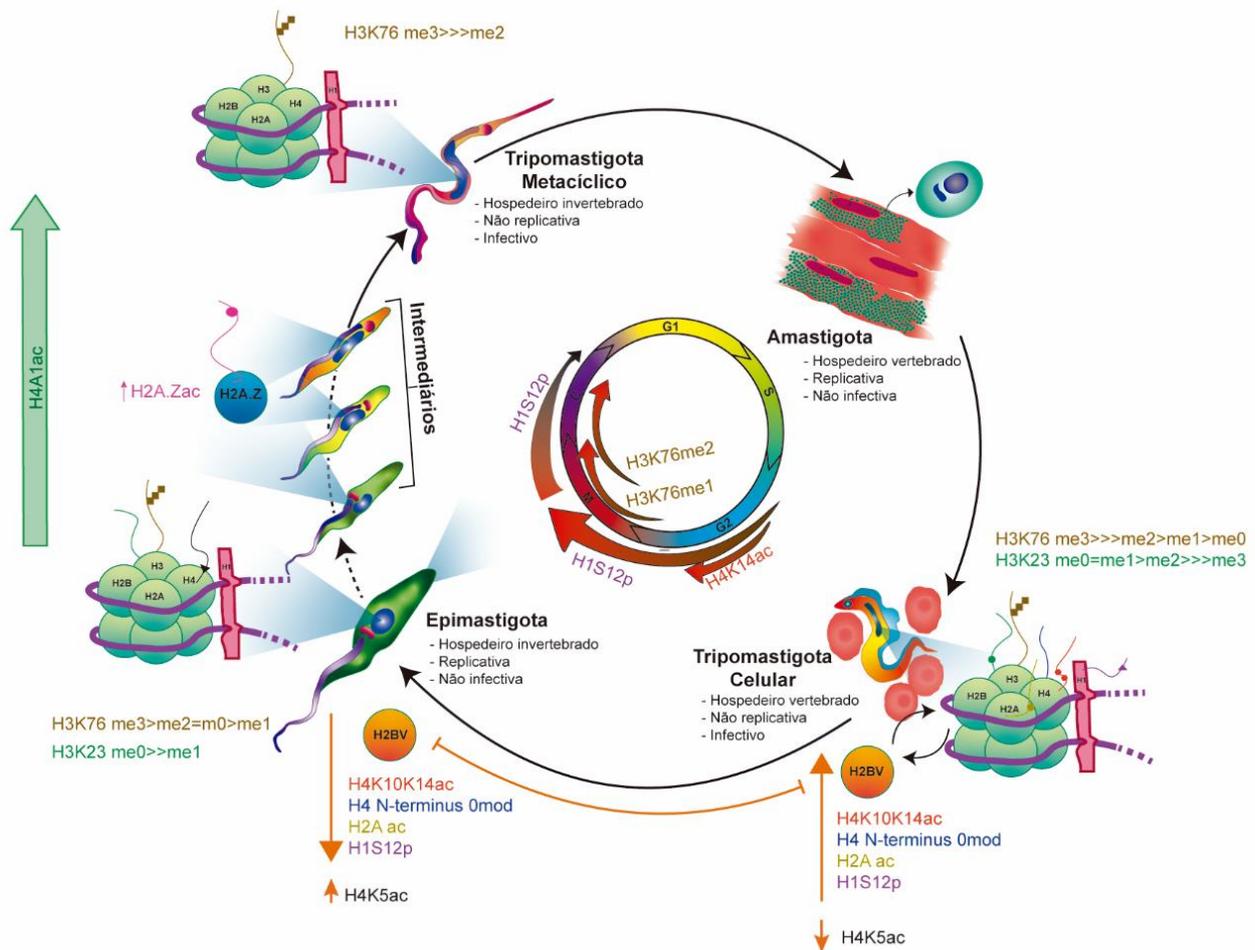
estudar MPTs nas histonas de *T. cruzi* (LIMA et al., submetido para publicação). Baseado em metodologias utilizadas com sucesso na análise de histonas em eucariotos superiores (SIDOLI et al., 2015, 2016), tanto a extração destas proteínas quanto a aquisição de dados para a espectrometria de massas foram otimizadas neste parasito. Adicionalmente, o *software* EpiProfile, utilizado na análise de peptídeos de histonas de 13 organismos diferentes (YUAN et al., 2015; YUAN et al., 2018), também foi adaptado para permitir uma melhor identificação e quantificação das modificações presentes nas histonas do *T. cruzi*.

A fim de melhorar e aumentar a detecção dos peptídeos de histonas durante a espectrometria de massas, as histonas extraídas do parasito foram quimicamente derivatizadas por propionilação e digeridas com tripsina. Apesar da análise dos dados ser mais complexa, devido à presença de um maior número de resíduos quimicamente modificados, a derivatização gera peptídeos trípticos mais longos, o que aumenta o tempo de retenção cromatográfica. Para quantificar os peptídeos de histonas, o espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição independente de dados (DIA, em inglês *data-independent acquisition*) (LIMA et al., submetido para publicação).

A utilização deste novo *workflow* permitiu a detecção de 141 peptídeos com modificações, que foram utilizados na avaliação da dinâmica das MPTs de histonas do *T. cruzi* Dm28c durante as etapas da metacicloênese, a saber i) epimastigotas em fase exponencial, ii) epimastigotas em fase estacionária, iii) parasitos em estresse nutricional, iv) parasitos aderidos à placa por 24 horas, v) parasitos aderidos à placa por 48 horas e vi) tripomastigotas metacíclicos purificados em coluna de DEAE. Os dados obtidos mostraram que, ao longo da diferenciação, a quantidade total de histonas acetiladas é menor que a de histonas metiladas. Além disso, foram observadas variações no nível global de metilação e acetilação de histonas durante as fases da metacicloênese. Aparentemente, mudanças transientes nas MPTs ocorrem durante todos os passos da metacicloênese, porém não se sabe qual é o papel destas flutuações no processo de diferenciação do parasito (LIMA et al., submetido para publicação).

Os 141 peptídeos detectados também foram utilizados para avaliar o padrão das modificações de histonas em três diferentes formas de vida do *T. cruzi*, a epimastigota, a tripomastigota metacíclica e a tripomastigota celular (Figura 1). Foi observado que o padrão de modificações de histonas encontrado na forma tripomastigota metacíclica é mais similar ao dos parasitos epimastigotas do que dos parasitos tripomastigotas celulares. Além disso, em comparação com as demais formas de vida, os parasitos tripomastigotas celulares apresentaram o menor nível de MPTs de histonas. Assim, é possível especular que as

diferenças nas condições ambientais das formas tripomastigota metacíclica (cultivada em meio TAU3AAG para mimetizar o intestino do triatomíneo) e tripomastigota celular (cultivada em meio DMEM para mimetizar a matriz extracelular de um tecido infectado) tem maior influência nos padrões de modificações de histonas do que as suas semelhanças quanto à morfologia, replicação e infectividade (LIMA et al., submetido para publicação).



**Figura 1.** Modificações pós-tradicionais nas histonas de *Trypanosoma cruzi* durante o seu ciclo celular e de vida.

O círculo central se refere a um esquema do ciclo celular, das formas epimastigotas, onde M se refere a mitose e C se refere a citocinese.

Além de aumentar o número de sítios de modificação de histonas identificados em *T. cruzi*, este novo protocolo permite a discriminação entre peptídeos isobáricos e facilita a investigação da dinâmica das MPTs de histona neste eucarioto antigo.

Outra ferramenta que tem facilitado o estudo das modificações epigenéticas em eucariotos é o sistema CRISPR-dCas9, no qual a endonuclease Cas9 está cataliticamente

inativa (dCas9, em inglês *dead Cas9*). Assim, a dCas9 pode ser direcionada, pelo sgRNA (em inglês *single guide RNA*), para uma região específica do DNA, porém não é capaz de inserir uma quebra de fita dupla na molécula. Isto permite a utilização desta enzima para estudar regiões específicas do genoma sem a necessidade de edição gênica. Com o intuito de melhor entender a relação entre certas modificações epigenéticas e a expressão de um gene em um *locus* específico, diversos experimentos tem fusionado a dCas9 a domínios enzimáticos capazes de metilar/desmetilar as bases do DNA ou de modificar as histonas. Estas abordagens permitem a associação entre um tipo de modificação epigenética e a regulação da expressão gênica. Além disso, a dCas9 tem sido utilizada em ensaios de imunoprecipitação de cromatina, o que permite a identificação de proteínas que interagem com *loci* específicos do genoma, incluindo histonas variantes e modificadas (revisado em XU; QI, 2019). No protozoário *Plasmodium falciparum*, os domínios de histona acetiltransferase (PfGNC5) ou de histona desacetilase (PfSir2a) foram fusionados à dCas9. Foi observado que o direcionamento destas endonucleases para sítios de início de transcrição alterou os níveis locais de acetilação de histona, resultando na ativação (pelo domínio GNC5) ou na repressão (pelo domínio Sir2a) da expressão gênica (XIAO et al., 2019). Atualmente, nosso grupo de pesquisa trabalha para estabelecer uma linhagem de *T. cruzi* que expresse constitutivamente a dCas9, o que permitirá a identificação de MPTs de histonas e proteínas associadas a *locus* específicos do genoma deste parasito.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo necessário se adaptar a ambientes com diferenças na temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes. A intrínseca relação entre o metabolismo e as modificações epigenéticas torna o estudo das MPTs nas histonas e das histonas variantes essencial para melhor compreender os mecanismos envolvidos no controle da expressão gênica deste protozoário. Neste sentido, como apresentado acima, diversos trabalhos têm sido realizados a fim de identificar as variantes e as modificações de histonas do *T. cruzi*, bem como de determinar a função destas modificações epigenéticas nas formas de vida do parasito. Atualmente, nosso grupo de pesquisa tem se concentrado na caracterização da variante H2B.V, mostrando o seu envolvimento no processo de metacicloogênese e infecção

celular. Adicionalmente, foi desenvolvido um *workflow* que permitiu aumentar de forma, considerável e acurada, os tipos de modificações de histonas encontradas em três formas de vida do *T. cruzi*. Para identificar variantes de histonas e MPTs e demais proteínas associadas a regiões específicas do genoma, usaremos o sistema CRISPR-dCas9, em abordagens *in vivo* e *in vitro*. Esperamos que os nossos resultados ajudem a elucidar como (ou se) as modificações epigenéticas participam dos mecanismos de controle da expressão gênica em *T. cruzi*, permitindo a sua adaptação em ambientes tão distintos.

## 4. AGRADECIMENTOS

JNR é bolsista CAPES de doutorado e HMCS é bolsista FAPESP de pós-doutorado (processo nº 2019/19834-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP). Parte dos resultados discutidos nesta revisão são frutos dos projetos processo nº 2018/15553-9, 2017/06104-3, 2018/14432-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## 5. REFERÊNCIAS

ADAM, M.; ROBERT, F.; LAROCHELLE, M.; GAUDREAU, L. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 18, p. 6270–6279, 2001.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. New York: Garland Science, 2002.

ALBIG, W.; KIOSCHIS, P.; POUSTKA, A.; MEERGANS, K.; DOENECKE, D. Human Histone Gene Organization: Nonregular Arrangement within a Large Cluster. **Genomics**, v.40, n. 2, p. 314–322, 1997.

ALSFORD, S.; HORN, D. Trypanosomatid histones. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 365–372, 2004.

ALTAF, M.; AUGER, A.; COVIC, M.; COTE, J. Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 87, n. 1, p. 35–50, 2009.

BANNON, G. A.; BOWEN, J. K.; YAO, M. C.; GOROVSKY, M. A. Tetrahymena H4 genes: structure, evolution and organization in macro- and micronuclei. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 4, p. 1961–1975, 1984.

- BELLI, S. I. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 6, p. 679-687, 2000.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669-681, 2007.
- BISWAS, S.; RAO, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. **European journal of pharmacology**, v.837, p.8-24, 2018.
- BITERGE, B.; SCHNEIDER, R. Histone variants: key players of chromatin. **Cell and tissue research**, v. 356, n. 3, p. 457-466, 2014.
- CARLBERG, C.; MOLNÁR, F. **The Histone Code BT - Human Epigenomics**. In: CARLBERG, C.; MOLNÁR, F. (org.). Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 75-88.
- COSTANZI, C.; PEHRSON, J. R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. **Nature**, v.393, n. 6685, p. 599-601, 1998.
- CREYGHTON, M. P.; MARKOULAKI, S.; LEVINE, S. S.; HANNA, J.; LODATO, M. A.; SHA, K.; YOUNG, R. A.; JAENISCH, R.; BOYER, L. A. H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. **Cell**, v.135, n. 4, p. 649-661, 2008.
- DA CUNHA, J. P. C.; NAKAYASU, E. S.; ELIAS, M. C.; PIMENTA, D. C.; TELLEZ-INON, M. T.; ROJAS, F.; MUNOZ, M. J.; ALMEIDA, I. C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, n. 1, p. 75-86, 2005.
- DA CUNHA, J. P. C.; NAKAYASU, E. S.; DE ALMEIDA, I. C.; SCHENKMAN, S. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 150, n. 2, p. 268-277, 2006.
- DE JESUS, T. C. L. et al. Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p.2039-2051, 2016.
- DRAIZEN, E. J.; SHAYTAN, A. K.; MARIÑO-RAMÍREZ, L.; TALBERT, P. B.; LANDSMAN, D.; PANCHENKO, A. R. HistoneDB 2.0: a histone database with variants--an integrated resource to explore histones and their variants. **Database: the journal of biological databases and curation**, v. 2016, p.baw014, 2016.
- ELIAS, M. C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79-90, 2001.
- GASPAR-MAIA, A. et al. MacroH2A histone variants act as a barrier upon reprogramming towards pluripotency. **Nature Communications**, v. 4, p. 1565, 2013.
- GAUTIER, T.; ABBOTT, D. W.; MOLLA, A.; VERDEL, A.; AUSIO, J.; DIMITROV, S. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. **EMBO reports**, v. 5, n. 7, p. 715-720, 2004.
- GLOVER, L.; HORN, D. Trypanosomal histone  $\gamma$ H2A and the DNA damage response.

**Molecular and biochemical parasitology**, v. 183, n. 1, p. 78–83, 2012.

GOSHIMA, T.; SHIMADA, M.; SHARIF, J.; MATSUO, H.; MISAKI, T.; JOHMURA, Y.; MURATA, K.; KOSEKI, H.; NAKANISHI, M. Mammal-specific H2A variant, H2ABbd, is involved in apoptotic induction via activation of NF-kappaB signaling pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11656–11666, 2014.

GUTUYAMA, L. M.; DA CUNHA, J. P. C.; SCHENKMAN, S. Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 4, p. 560–568, 2008.

HAKE, S. B.; ALLIS, C. D. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 17, p. 6428–6435, 2006.

HOEIJMAKERS, W. A. M.; SALCEDO-AMAYA, A. M.; SMITS, A. H.; FRANCOIJS, K.; TREECK, M.; GILBERGER, T.; STUNNENBERG, H. G.; BARTFAI, R. H2A.Z/H2B.Z double-variant nucleosomes inhabit the AT-rich promoter regions of the *Plasmodium falciparum* genome. **Molecular microbiology**, v. 87, n. 5, p. 1061–1073, 2013.

INGRAM, A. K.; HORN, D. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. **Molecular microbiology**, v. 45, n. 1, p. 89–97, 2002.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

IZZO, A.; KAMIENIARZ, K.; SCHNEIDER, R. The histone H1 family: specific members, specific functions? **Biological chemistry**, v. 389, n. 4, p. 333–343, 2008.

JESUS, T. C. L. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 23–38, 2017.

JIN, C.; ZANG, C.; WEI, G.; CUI, K.; PENG, W.; ZHAO, K.; FELSENFELD, G. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. **Nature genetics**, v. 41, n. 8, p. 941–945, 2009.

KAWAHARA, T.; SIEGEL, T. N.; INGRAM, A. K.; ALSFORD, S.; CROSS, G. A. M.; HORN, D. Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1054–1068, 2008.

KHORASANIZADEH, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 259–272, 2004.

KOSTOVA, N. N.; SREBREVA, L.; MARKOV, D. V.; SARG, B.; LINDNER, H. H.; RUNDQUIST, I. Histone H5-chromatin interactions in situ are strongly modulated by H5 C-terminal phosphorylation. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 3, p. 273–279, 2013.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, United States, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

- LI, G.; ZHU, P. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. **FEBS letters**, England, v. 589, n. 20 Pt A, p. 2893–2904, 2015.
- LIMA, L. P.; POUBEL, S. B.; YUAN, Z.; ROSON, J. N.; VITORINO, F. N.; HOLETZ, F. B.; GARCIA, B. A.; CUNHA, J. P. Improvements on the quantitative analysis of *Trypanosoma cruzi* histone post translational modifications: study of changes in epigenetic marks through the parasite's metacyclogenesis and life cycle. **Manuscrito submetido para publicação**.
- LOWELL, J. E.; KAISER, F.; JANZEN, C. J.; CROSS, G. A. M. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 24, p. 5721–5730, 2005.
- LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251–260, 1997.
- LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 7, p. 436–447, 2012.
- MALIK, H. S.; HENIKOFF, S. Phylogenomics of the nucleosome. **Nature structural biology**, v. 10, n. 11, p. 882–891, 2003.
- MANDAVA, V.; JANZEN, C. J.; CROSS, G. A. M. Trypanosome H2Bv replaces H2B in nucleosomes enriched for H3 K4 and K76 trimethylation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 368, n. 4, p. 846–851, 2008.
- MARINO-RAMIREZ, L.; KANN, M. G.; SHOEMAKER, B. A.; LANDSMAN, D. Histone structure and nucleosome stability. **Expert review of proteomics**, v. 2, n. 5, p. 719–729, 2005.
- MARZLUFF, W. F.; DURONIO, R. J. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 6, p. 692–699, 2002.
- MENEGHINI, M. D.; WU, M.; MADHANI, H. D. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 725–736, 2003.
- MONTELLIER, E. et al. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. **Genes & development**, v. 27, n. 15, p. 1680–1692, 2013.
- MUYLDERMANS, S.; LASTERS, I.; WYNS, L.; HAMERS, R. Protection of discrete DNA fragments by the complex H1-octamer-histones or H5-octamer-histones after micrococcal nuclease digestion. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 15, p. 3671–3680, 1981.
- NAKAYAMA, T.; TAKECHI, S.; OHSHIGE, T.; KONDO, K.; YAMAMOTO, K. Nucleotide sequences of two members of the chicken H4 histone-encoding gene family. **Gene**, v. 108, n. 2, p. 311–312, 1991.
- NARDELLI, S. C.; DA CUNHA, J. P. C.; MOTTA, M. C. M.; SCHENKMAN, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, v. 118, n. 4, p. 487–499, 2009.
- OLINS, D. E.; OLINS, A. L. Chromatin history: our view from the bridge. **Nature reviews**.

**Molecular cell biology**, v.4, n.10, p.809, 2003.

PALMER, D. K.; O'DAY, K.; WENER, M. H.; ANDREWS, B. S.; MARGOLIS, R. L. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. **The Journal of cell biology**, v. 104, n. 4, p. 805–815, 1987.

PASCOALINO, B.; DINDAR, G.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; MACHADO, C. R.; JANZEN, C. J.; SCHENKMAN, S. Characterization of two different Asf1 histone chaperones with distinct cellular localizations and functions in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 5, p. 2906–2918, 2014.

PICCHI, G. F. A.; ZULKIEVICZ, V.; KRIEGER, M. A.; ZANCHIN, N. T.; GOLDENBERG, S.; DE GODOY, L. M. F. Post-translational Modifications of *Trypanosoma cruzi* Canonical and Variant Histones. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 3, p. 1167–1179, 2017.

RAMOS, T. C. P.; NUNES, V. S.; NARDELLI, S. C.; DOS SANTOS PASCOALINO, B.; MORETTI, N. S.; ROCHA, A. A.; DA SILVA AUGUSTO, L.; SCHENKMAN, S. Expression of non-acetylatable lysines 10 and 14 of histone H4 impairs transcription and replication in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 204, n. 1, p. 1–10, 2015.

RESPUELA, P.; FERELLA, M.; RADA-IGLESIAS, A.; ASLUND, L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15884–15892, 2008.

RICHMOND, T. J.; DAVEY, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. **Nature**, v.423, p. 145, 2003.

SIDOLI, S.; BHANU, N. V.; KARCH, K. R.; WANG, X.; GARCIA, B. A. Complete Workflow for Analysis of Histone Post-translational Modifications Using Bottom-up Mass Spectrometry: From Histone Extraction to Data Analysis. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 111, p. 54112, 2016.

SIDOLI, S.; LIN, S.; XIONG, L.; BHANU, N. V.; KARCH, K. R.; JOHANSEN, E.; HUNTER, C.; MOLLAH, S.; GARCIA, B. A. Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra (SWATH) Analysis for Characterization and Quantification of Histone Post-translational Modifications. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 14, n. 9, p. 2420–2428, 2015.

SIEGEL, T. N.; HEKSTRA, D. R.; KEMP, L. E.; FIGUEIREDO, L. M.; LOWELL, J. E.; FENYO, D.; WANG, X.; DEWELL, S.; CROSS, G. A. M. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Development**, v. 23, n. 9, p. 1063–1076, 2009.

SIEGEL, T. N.; KAWAHARA, T.; DEGRASSE, J. A.; JANZEN, C. J.; HORN, D.; CROSS, G. A. M. Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 4, p. 762–771, 2008.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000.

SUTO, R. K.; CLARKSON, M. J.; TREMETHICK, D. J.; LUGER, K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. **Nature structural biology**, v. 7, n. 12, p. 1121–1124, 2000.

TAGAMI, H.; RAY-GALLET, D.; ALMOUZNI, G.; NAKATANI, Y. Histone H3.1 and H3.3

complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. **Cell**, v. 116, n. 1, p. 51–61, 2004.

TALBERT, P. B. et al. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. **Epigenetics & Chromatin**, v. 5, n. 1, p. 7, 2012.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Histone variants-ancient wrap artists of the epigenome. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 4, p. 264–275, 2010.

THAKAR, A. et al. H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 10852–10857, 2009.

THATCHER, T. H.; GOROVSKY, M. A. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 2, p. 174–179, 1994.

TORO, G. C.; GALANTI, N. H 1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental cell research**, v. 174, n. 1, p. 16–24, 1988.

TORO, G. C.; GALANTI, N. *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. **Biochemistry international**, v. 21, n. 3, p. 481–490, 1990.

VAN ATTIKUM, H.; GASSER, S. M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 5, p. 207–217, 2009.

VAN HOLDE, K. E.; SAHASRABUDDHE, C. G.; SHAW, B. R. A model for particulate structure in chromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 1, n. 11, p. 1579–1586, 1974.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 3, p. 178–189, 2015.

VILLANOVA, G. V.; NARDELLI, S. C.; CRIBB, P.; MAGDALENO, A.; SILBER, A. M.; MOTTA, M. C. M.; SCHENKMAN, S.; SERRA, E. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 6, p. 665–673, 2009.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n.1, p. 10–13, 2012.

WANG, H.; CAO, R.; XIA, L.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; BORCHERS, C.; TEMPST, P.; ZHANG, Y. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. **Molecular cell**, v. 8, n. 6, p. 1207–1217, 2001.

WATSON, J. D. Celebrating the genetic jubilee: a conversation with James D. Watson. Interviewed by John Rennie. **Scientific American**, v.288, n.4, p.66-69, 2003.

XIAO, B.; YIN, S.; HU, Y.; SUN, M.; WEI, J.; HUANG, Z.; WEN, Y.; DAI, X.; CHEN, H.; MU, J.; CUI, L.; JIANG, L. Epigenetic editing by CRISPR/dCas9 in *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 1, p. 255–260, 2019.

XU, X.; QI, L. S. A CRISPR-dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 1, p. 34–47, 2019.

YANG, X.; WU, X.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; XU, C.; LIAO, S.; TU, X. Recognition of

hyperacetylated N-terminus of H2AZ by TbBDF2 from *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical journal**, v. 474, n. 22, p. 3817–3830, 2017.

YUAN, Z.; LIN, S.; MOLDEN, R. C.; CAO, X.; BHANU, N. V.; WANG, X.; SIDOLI, S.; LIU, S.; GARCIA, B. A. EpiProfile Quantifies Histone Peptides With Modifications by Extracting Retention Time and Intensity in High-resolution Mass Spectra. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 14, n. 6, p. 1696–1707, 2015.

YUAN, Z.; SIDOLI, S.; MARCHIONE, D. M.; SIMITHY, J.; JANSSEN, K. A.; SZURGOT, M. R.; GARCIA, B. A. EpiProfile 2.0: A Computational Platform for Processing Epi-Proteomics Mass Spectrometry Data. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 7, p. 2533–2541, 2018.

ZLATANOVA, J.; LEUBA, S. H.; VAN HOLDE, K. Chromatin structure revisited. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 9, n. 3–4, p. 245–255, 1999.

ZLATANOVA, J.; THAKAR, A. H2A.Z: view from the top. **Structure (London, England : 1993)**, v. 16, n. 2, p. 166–179, 2008.

## PROTEÍNA P21: UM NOVO ALVO PARA O TRATAMENTO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA

Thaise Lara Teixeira<sup>1</sup>, José Franco da Silveira Filho<sup>1</sup>, Claudio Vieira da Silva<sup>2</sup>

1. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), Laboratório de Biologia Molecular de *Trypanosoma cruzi*, São Paulo, São Paulo, Brasil;

2. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Laboratório de Tripanosomatídeos, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas, expressa uma grande variedade de proteínas capazes de interagir com as células do organismo hospedeiro. Estas proteínas participam do processo de infecção, replicação e sobrevivência do parasito e, também, da patogênese da doença. A proteína P21 é um exemplo de proteína secretada por *T. cruzi* envolvida nos processos citados acima. Estudada por mais de uma década, diferentes atividades da P21 têm sido descritas e serão discutidas neste capítulo.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Proteína P21, Patogênese e Alvo terapêutico.

### ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, expresses a wide variety of proteins capable of interacting with the cells of the host organism. These proteins participate in the process of infection, replication and survival of the parasite and, also, in the pathogenesis of the disease. The P21 protein is an example of a protein secreted by *T. cruzi* involved in the processes mentioned above. Studied for over a decade, different activities of P21 have been described and will be discussed in this chapter.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, P21 protein, Pathogenesis and Therapeutic target.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas atinge 6-7 milhões de pessoas no mundo. Esta doença causa cerca de 10 mil mortes a cada ano, gerando um importante problema de saúde pública. Durante muitos anos, a doença de Chagas foi considerada uma doença estritamente rural e localizada apenas na América Latina. Porém, devido aos movimentos populacionais, atualmente, a maioria das pessoas

infectadas vive em ambientes urbanos e a doença se espalhou para vários continentes (WHO, 2020).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxênico, ou seja, envolve hospedeiros mamíferos e o hospedeiro invertebrado (insetos hemípteros da Família Reduvidae e subfamília Triatominea), conhecido popularmente como “barbeiro” (BARRETO, 1979). O *T. cruzi* apresenta 3 formas evolutivas durante o seu ciclo de vida: tripomastigota, amastigota e epimastigota (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere as formas tripomastigotas sanguíneas, presentes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Os tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas no sistema digestório do inseto, as quais multiplicam-se intensamente e, na porção final do intestino do vetor, transformam-se em formas infectantes, os tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto pica um novo hospedeiro, libera as formas infectantes juntamente com as fezes e urina, depositando-as no local da picada. Assim, ao coçar o local da picada, o hospedeiro vertebrado permite que as formas tripomastigotas penetrem ativamente pela pele lesionada e, invadam células nucleadas de vários tecidos, se transformando em formas amastigotas. Os amastigotas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea, podendo invadir outras células ou contaminar um outro inseto vetor, fechando assim o ciclo de vida do *T. cruzi* (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

A transmissão de *T. cruzi* ocorre, classicamente, pelo inseto vetor, por via contaminativa, como visto anteriormente. Entretanto, atualmente, a principal forma de transmissão no Brasil é a via oral, por meio da ingestão de alimentos (principalmente açaí e cana de açúcar) contaminados com as formas infectantes de *T. cruzi*. Contudo, a transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea, congênita, acidentes de trabalho e transplantes de órgãos de forma mais rara (WHO, 2020).

A infecção por *T. cruzi* apresenta condições clínicas variáveis. O início da infecção (fase aguda) é caracterizado por parasitemia sistêmica elevada. Nesta fase, os sintomas são inespecíficos e de intensidade variável. Após a fase aguda, indivíduos infectados não curados entram na fase crônica da doença. A fase crônica pode se manifestar como forma indeterminada (assintomática), forma cardíaca que acomete cerca de 30% dos indivíduos infectados, forma digestiva e mista. As duas últimas formas citadas causam alterações digestivas e/ou neurológicas em cerca de 10% dos pacientes (WHO, 2020).

O tratamento da doença de Chagas consiste basicamente no composto benzonidazol (Rochagan). Esse medicamento foi desenvolvido na década de 60, não é

específico e, é responsável por efeitos adversos que levam a baixa aderência do paciente ao tratamento. As reações adversas mais comuns a este medicamento são: dermatites, neuropatia, náuseas, vômitos e diarreia (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). Além disso, a utilização deste composto é contraindicada para pacientes grávidas ou com deficiência severa nos rins e fígado (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). E ainda, já foram descritas cepas resistentes à droga em condições experimentais (MEJIA et al., 2012; CAMPOS et al., 2014).

Durante a fase aguda, o tratamento atinge taxas elevadas de sucesso. Entretanto, na fase crônica, na qual não se sabe ao certo o papel do parasito, os medicamentos disponíveis são pouco eficazes (MARIN-NETO et al., 2007). Assim, a ausência de um tratamento universal para os pacientes com doença de Chagas, traz à tona um apelo para testar drogas mais eficazes e seguras. Além disso, encoraja estudos com o objetivo de obter melhor entendimento das relações patógeno-hospedeiro durante a fase crônica da doença (FRANCO-PAREDES; BOTAZZI; HOTEZ, 2009).

O comprometimento cardíaco é considerado a mais importante manifestação da Doença de Chagas (CUCUNUBÁ et al., 2016). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é uma miocardite que afeta as câmaras do coração, nervos cardíacos parassimpáticos e todo o sistema de condução sanguíneo (MARIN-NETO et al., 2007). Entretanto, a patogênese do dano cardíaco, como consequência da infecção por *T. cruzi*, é complexa e não completamente entendida. Quatro possíveis mecanismos têm sido sugeridos: 1-anomalias microvasculares levando a isquemia do miocárdio, 2-despopulação cardíaca neuronal parassimpática, 3-injúria ao tecido cardíaco mediada pela autoimunidade e, 4-persistência parasitária ao longo dos anos, provocando uma estimulação antigênica secundária contínua (MARIN-NETO et al., 2007; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA-NUNES et al., 2013).

A presença do parasito no tecido cardíaco ao longo do tempo, tem sido considerada por estudiosos, uma causa importante das disfunções patológicas no coração (HIGUCHI et al., 1993; BELLOTTI et al., 1996). Estudos utilizando animais e, também em humanos, identificaram material genético e antígenos de *T. cruzi* em focos inflamatórios cardíacos (FRANCO, 1990; JONES et al, 1993; SABINO et al., 2015). Além disso, outros estudos demonstram uma correlação entre a variação da carga parasitária e os fenômenos de atenuação ou da exacerbação da cardiomiopatia, sugerindo que a presença do parasito é importante na patogênese da CCC (GARCIA et al., 2005; HEALY et al., 2015). Entretanto,

os mecanismos empregados pelos parasitos para persistirem no tecido cardíaco são pouco compreendidos (HEALY et al., 2015).

No que diz respeito à interação entre o patógeno e as células hospedeiras, a adesão às células é o primeiro passo para a invasão do *T. cruzi*. Diversas glicoproteínas de superfície com propriedades de adesão celular têm sido estudadas nas formas infectantes do parasito, tais como: gp82, gp30 e gp35/50 (YOSHIDA, 2006). Estas gps se ligam às células alvo e ativam vias de sinalização intracelular, provocando a mobilização de Ca<sup>+</sup>, que resulta na internalização do parasito nas células hospedeiras (MARTINS et al., 2011).

Após sua entrada nas células, os parasitos ficam localizados em um compartimento celular, conhecido como vacúolo parasitóforo (VP), do qual eles escapam, transformam-se em amastigotas e vão replicar no citoplasma. Já é sabido que a TC-TOX, uma hemolisina com ação lítica secretada pelo parasito, está envolvida no rompimento dos VPs (ANDREWS; WHITLOW, 1989). Além da TC-TOX, outro estudo demonstrou que a enzima neuraminidase/trans-sialidase (TS) também participa do processo de rompimento dos VPs (HALL et al., 1992). Após alguns ciclos de replicação binária no citoplasma, os parasitos são liberados para o meio extracelular, podendo disseminar a infecção (FERNANDES; ANDREWS, 2012).

Existem diversas outras sequências de proteínas hipotéticas pouco estudadas e descritas que podem estar relacionadas com os mecanismos infecciosos do *T. cruzi* (MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012). Nesse sentido, este capítulo descreve as atividades biológicas de uma proteína secretada por *T. cruzi*, chamada P21. A proteína P21 está relacionada com a entrada do parasito nas células hospedeiras, possui atividade quimiotática para células da resposta imune, inibe a angiogênese, induz a produção de colágeno e, modula o ciclo celular do parasito.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA P21

A proteína descrita por Silva et al. (2009) possui aproximadamente 21 kDa e por isso foi denominada de P21. Utilizando ferramentas de bioinformática foi possível prever características da P21, as quais permitiram categorizá-la como uma proteína secretada,

como: sítios de glicosilação, fosforilação e a presença de peptídeo sinal. A partir dessas informações, os pesquisadores produziram a forma recombinante da proteína (rP21) por meio da clonagem da sequência gênica da P21 (465 bp) em um vetor plasmidial de expressão, o pET28a (+), substituindo a sequência do peptídeo sinal por 6 resíduos de histidina. O inserto clonado no vetor de expressão foi usado na transformação de bactérias *Escherichia coli* (BL-21) para produção da proteína recombinante. A purificação da rP21 foi realizada por cromatografia de afinidade (coluna de níquel, pois possui alta afinidade por resíduos de histidina) e, após, a proteína foi dialisada para retirar impurezas.

Além disso, neste estudo inicial, foi realizada a análise da expressão da proteína P21, pela técnica de western blot, demonstrando que ela é produzida e secretada por todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. A detecção da P21 nativa expressa pelos parasitos foi possível por meio de anticorpos policlonais obtidos previamente a partir da imunização de camundongos com a forma recombinante da P21. Esta informação nos permite especular que a proteína recombinante possui similaridade considerável àquela secretada pelo parasito, pois foi capaz de induzir a produção de anticorpos que reconhecem ambas as proteínas, recombinante e nativa.

Neste mesmo estudo, os pesquisadores apresentaram as primeiras evidências relacionadas à função biológica da P21. Células epiteliais tumorais humanas (HeLa) foram infectadas com *T. cruzi* na presença ou não de diferentes concentrações da proteína recombinante. Os resultados mostraram que em células tratadas com rP21 (20µg/ml e 40µg/ml) a taxa de invasão é mais alta, o que sugeriu um papel dessa proteína no processo de infecção.

## 2.2 P21 E FAGOCITOSE

Mais tarde, em uma pesquisa desenvolvida por Rodrigues et al. (2012), o papel da P21 no processo de invasão do parasito na célula hospedeira foi melhor compreendido. *T. cruzi* é capaz de invadir e multiplicar-se em macrófagos por meio da interação com diferentes receptores de superfície e induzir sua própria fagocitose (ALCANTARA; BRENER, 1980; KAHN et al., 1995). Assim, os pesquisadores examinaram o potencial da rP21 em induzir a fagocitose em macrófagos murinos utilizando partículas de zimosan (glucano encontrado na superfície de microrganismos, como os fungos, capaz de induzir a fagocitose) e diferentes protozoários: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Toxoplasma gondii*. Como resultado, na presença da P21 a taxa de fagocitose de zimosan em

macrófagos aumentou em todos os tempos de incubação analisados (1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas) e, quando as células foram incubadas com outros parasitos, o mesmo resultado foi obtido. Assim, a rP21 é uma indutora inespecífica da fagocitose. Para descartar qualquer interferência de endotoxinas bacterianas nos resultados, diferentes controles foram empregados, tais como, tratamento com polimixina B e ensaios com macrófagos peritoneais oriundos de camundongos nocautes para o receptor Toll-like 4 (receptor específico para LPS).

A partir destes dados, o estudo focou-se na busca do mecanismo celular pelo qual a P21 poderia atuar no aumento do processo fagocítico. Qual via de sinalização intracelular a proteína P21 ativaria para desempenhar esta função? Para responder esta pergunta, inibidores de diferentes vias de sinalização (PI3quinase, AKT, nRAS, ERK2 e MEK1/2 e mTOR) foram utilizados nos ensaios de fagocitose. Os resultados demonstraram que apenas a inibição da PI3quinase inibiu a atividade pró-fagocítica promovida pela rP21, sugerindo ser esta a via que a proteína ativa durante sua função biológica. PI3quinase (fosfatidilinositol-3 quinase) consiste em uma família de enzimas envolvidas nas cascatas de sinalização intracelulares que culminam em atividades celulares chave como crescimento, proliferação, diferenciação, mobilidade e endocitose. Sabendo disso, qual poderia ser o receptor envolvido nesse processo, mediando a P21 e a ativação da PI3K?

Considerando a variedade de receptores de superfície, a hipótese foi de que receptores acoplados à proteína G (grande família de receptores transmembrana que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinais intracelulares, culminando em atividade celulares) poderiam interagir com a P21. Para testar esta hipótese, Rodrigues et al. (2012) realizaram ensaio de fagocitose utilizando um inibidor do receptor CXCR4 (receptor de quimiocinas do tipo 4) e macrófagos nocautes para o receptor CCR4 (outro receptor de quimiocinas 4). Apesar das células nocautes para o receptor CCR4 reduzirem a atividade pró-fagocítica na presença da rP21, em comparação com as células não tratadas, ainda há indução da fagocitose. Porém, quando as células foram tratadas com inibidor do CXCR4, a atividade pró-fagocítica da P21 foi totalmente anulada. Estes dados sugeriram que o CXCR4 pode ser o receptor da P21 e que a indução da fagocitose ocorre de forma dependente da ativação da via PI3quinase.

## 2.3 O PAPEL DA P21 NA INFLAMAÇÃO

A partir dos dados relacionando a P21 ao CXCR4 e, sabendo que este receptor está relacionado a processos inflamatórios e ao recrutamento de células da resposta imune, Teixeira et al. (2015) estudaram o papel da P21 no processo inflamatório. Para isso, utilizaram um modelo experimental de inflamação crônica, que consiste no implante subcutâneo de matrizes esponjosas sintéticas em camundongos (C57BL/6). Este modelo experimental simula as etapas de reparo tecidual por meio da inserção de um corpo estranho nos animais e, permite a análise do processo inflamatório crônico (9 a 14 dias). Neste cenário foi possível analisar e caracterizar os componentes envolvidos na formação do tecido de granulação, tais como: recrutamento de células inflamatórias, fluidos (hemoglobina), citocinas e enzimas (mieloperoxidase-MPO e N-acetil-beta-glucosaminidase-NAG) liberados pelas células inflamatórias no local do reparo (BAILEY, 1988).

Assim, utilizando esse modelo de estudo foram adquiridos dados qualitativos e quantitativos sobre mediadores inflamatórios, angiogênese e os tipos de células inflamatórias recrutadas comparando implantes tratados com rP21 e tratados com solução salina (PBS), o grupo controle. Um extrato bacteriano (EB), obtido a partir do processo de purificação da proteína recombinante, sem o vetor de expressão, foi utilizado como um outro controle, com o intuito de garantir que os resultados gerados não ocorreram devido a fatores provenientes de componentes bacterianos.

Após nove dias de inoculação de rP21, EB ou PBS diretamente nos implantes a cada 72 horas, os animais foram eutanasiados e as esponjas recuperadas para distintas análises. O primeiro aspecto analisado foi a produção das citocinas inflamatórias: Interleucina-1 beta e Fator de Necrose Tumoral-alfa (IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e, anti-inflamatória: Interleucina-4 (IL-4). Os dados mostraram que ambos grupos tratados com rP21 e EB reduziram a produção de citocinas inflamatórias nos implantes, comparados ao controle tratado com PBS. Por outro lado, enquanto o EB inibiu a produção de IL-4, o tratamento com a rP21 aumentou os níveis desta citocina.

Pesquisas envolvendo a patologia e a resposta imune da infecção por *T. cruzi* mostram que as imunidades inata e adaptativa desempenham importante papel no controle do parasito, pela ação combinada entre células inflamatórias como linfócitos NK que são células matadoras naturais e linfócitos CD4+ e CD8+, bem como, a produção de anticorpos específicos pelas células B. Assim, a resistência à infecção por *T. cruzi* está associada com

a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas ativam a produção de óxido nítrico em macrófagos, os quais ajudam a eliminar o parasito (revisado por RODRIGUES et al., 2012).

Por outro lado, as citocinas IL-4 e TGF- $\beta$  estão associadas à susceptibilidade a infecção por *T. cruzi* (CHO; REISER, 1998). Estudos mostram que o aumento da produção de IL-4 dirige a resposta imune para um perfil Th2 ou humoral, caracterizado pela produção de anticorpos e redução das respostas celulares. Entretanto, a infecção por *T. cruzi* é intracelular obrigatória e por isso a resposta imune polarizada para o perfil Th2 não é, sozinha, eficaz. Além disso, pesquisas relacionam a produção de IL-4 à redução da apoptose de linfócitos B e ao bloqueio da diferenciação dessas células em plasmócitos na infecção por *T. cruzi*, favorecendo o desenvolvimento de células B de memória. Este fenótipo resulta em produção reduzida de anticorpos específicos contra o parasito (ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004). Dessa forma, a indução da expressão de IL-4 pela rP21 pode fornecer um ambiente intracelular mais adequado para perpetuar a infecção.

Além disso, neste estudo, o perfil inflamatório de células foi analisado e as enzimas MPO e NAG, produzidas por neutrófilos e macrófagos, respectivamente, foram dosadas como indicadores da presença desses tipos celulares no tecido. Mieloperoxidase ou MPO são enzimas lisossomais produzidas por neutrófilos ativados, em sua fase inicial de maturação. Essas enzimas catalisam a produção de ácido hipocloroso que são citotóxicos aos microrganismos intracelulares. Entretanto, quando estes compostos vão para o ambiente extracelular podem causar danos teciduais e resultar em patologias (DE ARAUJO et al., 2013). Já a N-acetil-beta-D-glucosaminidase ou NAG é uma hidrolase produzida por macrófagos, está presente em lisossomos e, também participa do processo de eliminação de patógenos intracelulares.

Os resultados destas análises mostraram que os implantes tratados com rP21 aumentaram a produção de MPO mas, mantiveram os níveis de NAG, quando comparados aos grupos controles (EB e PBS). Por outro lado, a análise histopatológica demonstrou que as esponjas tratadas com rP21 exibem infiltrado inflamatório moderado, composto principalmente por macrófagos. Já as esponjas tratadas com EB apresentaram infiltrado intenso composto por neutrófilos, linfócitos e, ainda, a presença de necrose tecidual. Em ambos os grupos, as alterações foram avaliadas comparando os dados ao grupo tratado com PBS, que serve como modelo do processo de reparo tecidual normal. A contradição aparente entre o aumento da enzima MPO e do aumento de macrófagos, e não de neutrófilos, encontrado na análise histopatológica foi explicada pela expressão desta

enzima também por macrófagos (DE ARAUJO et al., 2013). Estudo mostrou que o fator estimulador de colônias de macrófagos (MCSF) é um regulador endógeno da produção de MPO em macrófagos e está relacionado a disfunções em tecidos endoteliais como aterosclerose (SUGIYAMA et al., 2001).

Um estudo anterior demonstrou que rP21 induz a fagocitose de forma dependente da ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4. Esta interação poderia indicar um papel da P21 no recrutamento de células inflamatórias. Para testar esta hipótese, os pesquisadores realizaram ensaios *in vitro* e *in vivo* com o intuito de determinar o efeito da P21 sobre a migração de leucócitos. O ensaio *in vitro* demonstrou aumento do recrutamento de neutrófilos, em câmara de boyden, provocado pela rP21. O experimento *ex vivo* foi realizado por meio da inoculação de rP21, EB ou PBS na cavidade peritoneal de camundongos em diferentes tempos (30 minutos, 2 horas e 6 horas). Após cada tempo, o conteúdo peritoneal recuperado foi analisado por citometria de fluxo, a qual permitiu diferenciar as populações de granulócitos, linfócitos e monócitos. Os dados mostraram que o tratamento com rP21 induziu um aumento no recrutamento total de leucócitos e em todas as subpopulações analisadas após 2 horas de tratamento, em comparação com os grupos controles (EB e PBS). Os resultados *in vitro* e *ex vivo* corroboraram e, por isso, reforçaram a hipótese do papel quimiotático da P21 no processo inflamatório.

Após obterem estes dados, os pesquisadores investigaram o recrutamento de mastócitos nos cortes histológicos dos implantes esponjosos e observaram aumento do número dessas células nos tecidos tratados com rP21. Este resultado corroborou com o aumento dos níveis de expressão de IL-4 induzidos pelo tratamento com a proteína recombinante, pois é sabido que a IL-4 se relaciona com a maturação, sobrevivência, proliferação e migração de mastócitos.

Outra descoberta interessante sobre as atividades biológicas da P21 foi descrita neste estudo. A análise da produção de hemoglobina revelou a redução nos níveis desta substância nos implantes tratados com rP21, sugerindo um papel anti-angiogênico. Com o intuito de investigar essa proposição, o número total de vasos sanguíneos foi determinado pela contagem de vasos nos cortes histológicos, comparando-se os grupos. O número de vasos encontrados nos cortes dos implantes tratados com rP21 foi menor do que a metade encontrada no grupo tratado com PBS. Além disso, foi realizado ensaio *in vitro* utilizando células endoteliais derivadas de hemangioma tímico murino (tEND) plaqueadas sobre matrigel, (substância que contém componentes da matriz extracelular como: laminina, colágeno tipo IV, nidogênio e sulfato de heparano) e tratadas com rP21, EB ou PBS por 24

horas. Neste ensaio, a presença da rP21 inibiu a formação de vasos sanguíneos sem causar perda da viabilidade das células endoteliais, enquanto o EB foi citotóxico e não foi possível analisar a formação de vasos sanguíneos. Os dados apresentados até aqui sugerem que a secreção da P21 pelos parasitos tem um papel durante a infecção e no desenvolvimento da patogênese da doença de Chagas.

## 2.4 ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DA P21

No estudo anterior, foi visto a inibição da formação de vasos após tratamento com rP21. Mas, uma pergunta intrigante foi levantada: qual é o mecanismo de ação da proteína P21 no processo de angiogênese?

A pesquisa desenvolvida por Teixeira et al. (2017) teve como objetivo responder essa pergunta. Assim, primeiramente foi avaliado o efeito do tratamento com rP21 sobre componentes da matriz extracelular como fibrinogênio e fibronectina, comparando com o grupo não tratado. Entretanto, a rP21 não foi capaz de degradar os componentes avaliados. Além disso, os pesquisadores analisaram se a atividade anti-angiogênica da rP21 ocorre pela interação com os componentes da matriz extracelular ou, diretamente com as células endoteliais. Para isso, células endoteliais foram tratadas com rP21, depois lavadas ou não e, plaqueadas sobre uma camada de matrigel. Os dados revelaram que, em ambos os casos, a rP21 foi capaz de inibir o processo de angiogênese, indicando uma interação direta da proteína com as células endoteliais.

Outro resultado interessante evidenciado neste estudo envolveu a interação e internalização da rP21 pela membrana das células tEND. A partir disso, duas outras perguntas surgiram: 1-Poderia a P21 desencadear a ativação da transdução de sinais intracelulares que culminam na inibição da angiogênese? 2-Esta interação ocorreu através da presença de receptores CXCR4? Para responder estas perguntas, a análise da expressão de CXCR4 nas células endoteliais foi realizada por citometria de fluxo e, mostrou que, naturalmente, as células endoteliais expressam alta quantidade de CXCR4. E ainda, quando as células foram tratadas com inibidor do CXCR4, a atividade anti-angiogênica da P21 foi perdida. Estes dados sugeriram que o efeito da proteína sobre a angiogênese é também dependente da interação com o receptor.

Ademais, o estudo demonstrou que a rP21 interfere na proliferação das células endoteliais e na expressão de genes relacionados a angiogênese nos tempos de 24 e 72 horas. No tempo de 24 horas, a rP21 aumentou os níveis de sFIt-1 (tirosina quinase 1

solúvel semelhante a *fms 1*) e reduziu a expressão de VEGFA (fator de crescimento endotelial vascular A). Já no tempo de 72 horas, o tratamento com rP21 aumentou a expressão de MMP9 (metaloproteinase A), sFlt-1 e VGFA e reduziu a expressão de Flt-1.

O processo de angiogênese ocorre por meio do equilíbrio de fatores que induzem a ativação de sinais pró e anti-angiogênicos, ou seja, o desequilíbrio entre indutores e inibidores das células endoteliais podem resultar no comprometimento da angiogênese durante um processo de reparo tecidual. MMP9 é uma enzima expressa em células endoteliais e é capaz de degradar componentes da matriz extracelular (BENDECK, 2004). Já o VEGFA atua como uma citocina potente que induz o crescimento de células endoteliais e inibe a apoptose dessas células, promovendo a angiogênese. O Flt-1 é um receptor para VEGF relacionado à ativação da angiogênese. Este receptor alterna em uma forma solúvel (sFlt-1) que se liga ao VEGF livre, disponível para se ligar ao receptor e, dessa forma, o aumento de sFlt-1 se relaciona com a inibição da angiogênese (ROBERTS et al., 2004).

A partir dessas informações, o desbalanço da cascata de sinalização nas células endoteliais causada pela rP21 elucidada a atividade anti-angiogênica. Isso acontece, pois, a inibição inicial (24 horas) da angiogênese na presença da rP21 pode ser explicada pelo aumento dos níveis de sFlt-1 e, a inibição continuada da angiogênese está, provavelmente, relacionada com a regulação negativa de Flt-1 no tempo de 72 horas. Além disso, é sabido que a IL-4 induz macrófagos à aquisição de um fenótipo alternativo, M2, caracterizado pelo aumento da expressão de sFlt-1, molécula conhecida por seu papel anti-angiogênico. Sabendo disso, poderia a P21 ter um papel na patogênese da Doença de Chagas?

## 2.5 P21 E A PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS

Ao longo do tempo, estudos têm mostrado uma variedade de atividades biológicas relacionadas a P21. Porém, o papel dessa proteína na infecção por *T. cruzi* permanece pouco elucidada. Assim, Teixeira et al. (2019) tiveram como objetivo estudar o papel da P21 na patogênese da doença de Chagas em sua fase aguda tardia (6 semanas após a infecção) em camundongos BALB/c. A fase aguda tardia parece ser um momento interessante de ser estudado na infecção por *T. cruzi* pois pode trazer novos *insights* sobre o processo de cronificação da doença de Chagas e suas implicações.

Para desenvolver este trabalho, como um primeiro passo, a estabilidade funcional da P21 em soro murino foi avaliada. Assim, a rP21 foi incubada por 72 horas com soro de camundongos saudáveis. Após este tempo, a atividade pró-fagocítica da rP21 foi testada

utilizando macrófagos e zimosan. Os resultados mostraram que a incubação com soro não anula o efeito da rP21 em induzir a fagocitose.

Outro experimento realizado pelo grupo de pesquisa avaliou a capacidade da rP21 induzir a produção de anticorpos. Para isso camundongos não infectados foram tratados com rP21 a cada 72h, por 6 semanas. Uma vez por semana, o soro dos animais foi coletado e avaliado quanto à produção de anticorpos anti-rP21, comparados a um controle obtido previamente pela imunização de camundongos com rP21 e adjuvantes. Os dados mostraram que rP21 sozinha não tem alto potencial imunogênico.

A partir dessas informações, os autores infectaram as patas traseiras de camundongos BALB/c por via subcutânea com tripomastigotas de *T. cruzi*, e trataram os animais com PBS, BSA ou rP21 a cada 72 horas, ao longo de 6 semanas. Grupos controle compostos de camundongos não infectados e tratados também foram realizados. E, ao final das 6 semanas, os camundongos foram eutanasiados e os seguintes órgãos foram analisados: patas, linfonodos popliteais e coração.

Os dados demonstram que os animais tratados com a rP21 apresentaram uma patogênese mais agressiva, quando comparada aos grupos controles. Os linfonodos popliteais aumentaram de tamanho nos grupos tratados com rP21, bem como, houve maior recrutamento de células inflamatórias em todo o tecido cardíaco, neste grupo. Estes dados parecem corroborar com os dados de quimiotaxia e indução da inflamação, demonstrados anteriormente. Além disso, o tratamento com rP21 induziu aumento na deposição de colágeno total no tecido do coração, indicando aumento da fibrose. Assim, este trabalho traz a primeira evidência da atividade da P21 na deposição de colágeno.

Os pesquisadores também avaliaram a carga parasitária no tecido cardíaco e, surpreendentemente, os animais tratados com rP21 tiveram redução da carga parasitária em comparação com os grupos controles. Assim, surgiu a seguinte pergunta: poderia a P21 modular a replicação dos parasitos?

Para testar esta hipótese o grupo de pesquisa analisou *in vitro* o efeito do tratamento com a rP21, após 72 horas de tratamento, sobre a replicação intracelular de amastigotas em macrófagos. E ainda, analisou a replicação e o ciclo celular de epimastigotas na presença ou não de rP21. Os resultados demonstram claramente que a rP21 reduz a replicação intracelular de amastigotas. Além disso, foi capaz de reduzir a replicação e modular o ciclo celular de epimastigotas, aumentando a fase G1 e reduzindo a fase S.

O processo de cronicidade da doença de Chagas ainda é pouco compreendido. Autores descrevem que o papel da resposta imune do hospedeiro é crucial na redução da

parasitemia após a fase aguda (MARINHO et al., 2004). Além disso, atribuem a exacerbação da inflamação como causa de dano tecidual durante a fase crônica (BELLOTTI et al., 1996; SABINO et al., 2015; PEREIRA-NUNES et al., 2013). Por outro lado, outros autores acreditam que as proteínas secretadas pelos parasitos podem desempenhar, ao longo do tempo, um papel ativo na patologia da doença (GARCIA et al., 2005; HEALEY et al., 2015). Embora a origem da patologia da doença ainda seja controversa, existe um consenso de que o controle da replicação ou dormência do parasita é um fator crucial para perpetuação da infecção por *T. cruzi* e sobrevivência do hospedeiro mamífero (SÁNCHEZ-VALDÉZ, 2018).

Assim, neste estudo foi proposto que a P21 secretada por *T. cruzi* tenha algum papel no desenvolvimento das características patológicas presentes na fase crônica da doença de Chagas. Além disso, a P21 pode contribuir para redução da parasitemia, tornando o parasito imperceptível à resposta imune, garantindo a perpetuação da infecção. Entretanto, os mecanismos pelos quais a P21 induz a deposição de colágeno, aumenta a inflamação e controla a replicação do parasito, são ainda desconhecidos.

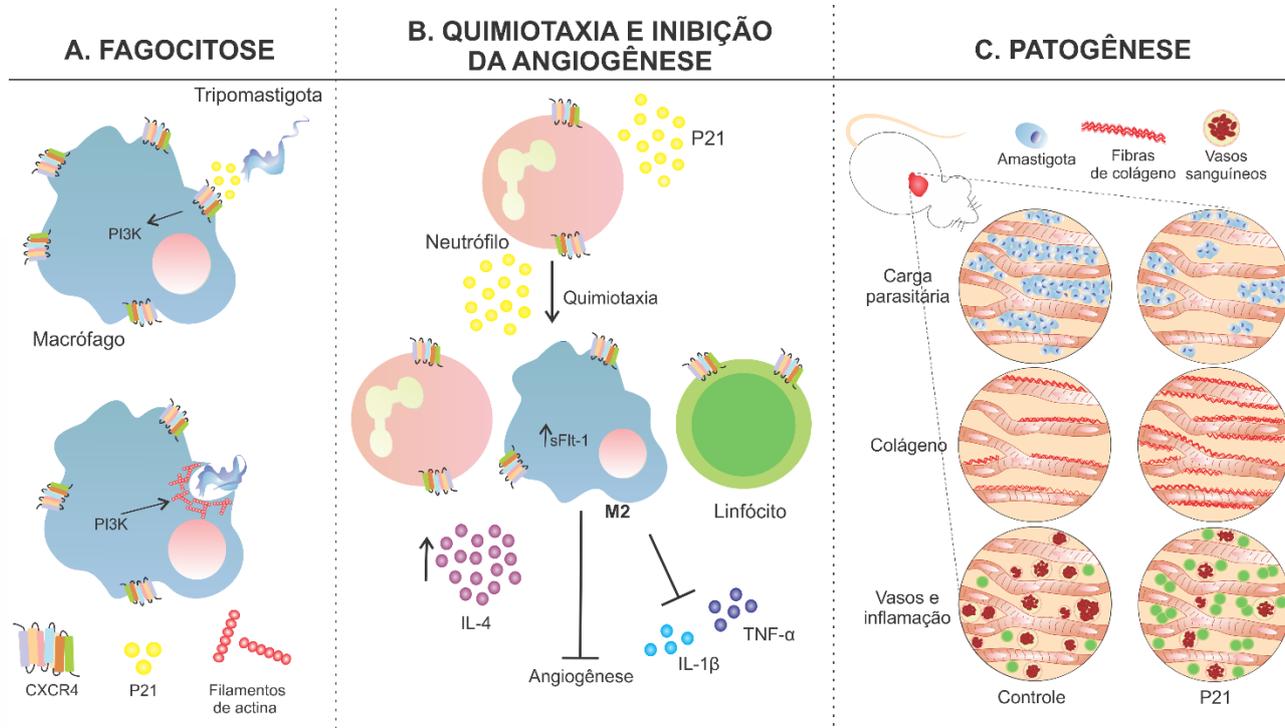
### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença de Chagas é considerada um problema relevante de saúde pública levando a complicações socioeconômicas de grande extensão e complexidade. Embora muitos esforços no controle da transmissão vetorial vêm sendo bem sucedidos, os resultados destas medidas não beneficiam diretamente os milhões de indivíduos infectados, tampouco os pacientes chagásicos com manifestações clínicas da doença.

Os agentes terapêuticos disponíveis são eficazes apenas na fase aguda da doença e apresentam alta toxicidade. Desta forma, a prospecção de novas formas terapêuticas específicas, não tóxicas e com eficácia nas diferentes fases da doença e, que levem à cura parasitológica, é de grande relevância no cenário internacional, o que poderá beneficiar milhões de pessoas no Brasil e no mundo.

Empregando a forma recombinante da P21 observamos que esta proteína promove a permanência intracelular do parasita, controla a multiplicação parasitária, associa-se a alterações histopatológicas e parece ter papel crucial no processo de cronificação da doença (Figura 1). Quanto mais descrevemos as atividades biológicas da proteína, mais

instigados ficamos em propor o desenvolvimento de terapias específicas para a doença de Chagas que tenham como alvo a proteína 21 de *Trypanosoma cruzi*.



**Figura 1.** Atividades biológicas da proteína P21 de *T. cruzi*.

A: A proteína P21 secretada pelo parasito dentro do organismo hospedeiro, se liga ao receptor transmembrana CXCR4 presente em macrófagos e, ativa a via de sinalização intracelular PI3quinase (PI3K), induzindo a fagocitose; B: A P21 promove a quimiotaxia de leucócitos por um mecanismo ainda não descrito. Entretanto, inibe a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e induz a produção da citocina IL4. A IL-4, por sua vez, altera o fenótipo de macrófagos para um perfil M2, o qual aumenta a produção de sFlt1, inibindo a angiogênese; C: Camundongos tratados com P21 e infectados com *T. cruzi* apresentam, no tecido cardíaco, redução da replicação parasitária, deposição de colágeno aumentada, redução do número de vasos e aumento de células inflamatórias, comparado ao controle tratado com PBS. Porém, os mecanismos pelos quais a P21 contribui para a patogênese da doença de Chagas ainda permanecem desconhecidos

Assim, nossos próximos estudos visam estabelecer uma estratégia para contornar os problemas inerentes aos agentes terapêuticos disponíveis, como a alta toxicidade, ineficácia e surgimento de cepas resistentes. Nesse sentido, conjecturamos a terapia a base de peptídeos (pequenas sequencias lineares de aminoácidos) como uma excelente opção. O papel de peptídeos como moduladores-chave das funções biológicas, com baixa toxicidade e alta especificidade, os torna atrativos agentes terapêuticos. Os benefícios incluem uma baixa ligação inespecífica, baixa imunogenicidade e ausência de acúmulo nos

tecidos, o que reduz riscos de efeitos colaterais tóxicos. Além disso, a ausência de proteínas homólogas a P21, reduz ainda mais a probabilidade de ocorrerem interações inespecíficas.

Desta forma, pretendemos aliar as vantagens da terapia baseada em peptídeos com os dados obtidos a respeito da P21 de *T. cruzi*, um componente importante para a infecção e permanência do parasita no hospedeiro, gerando assim, um painel de peptídeos antagonistas e/ou agonistas que poderão mudar o cenário atual sobre o tratamento da doença de Chagas no mundo.

## 4. QUESTÕES ÉTICAS

Todos os trabalhos relacionados à proteína P21 descritos neste capítulo possuem número de aprovação do comitê de ética emitida pela Instituição na qual os estudos foram desenvolvidos, quando houve necessidade.

## 5. REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRÍGUEZ, E.V.; MONTES, C.L.; MOTRÁN, C.C.; ZUNIGA, E.I; LIU, F.T; RABINOVICH, G.A.; GRUPPI, A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 172, n.1, p. 493-502, 2004.

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. **Exp Parasitol**, v. 50, n.1, p. 1-6, 1980.

ANDRADE, J.P.; MARIN-NETO, J.A.; PAOLA, A.A.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G.M. BACAL, F.; et al. Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arq Bras Cardiol**, v. 96, n.6, p. 434-442, 2011.

ANDREWS, N.W.; WHITLOW, M.B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol. Biochem Parasitol**, v. 33, n.3, p. 249-256, 1989.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methods in Enzymol.**, v. 162, p. 327-334, 1988.

BARRETO, M. P. **Epidemiologia**. In: BRENER Z, ANDRADE Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89-151, 1979.

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E.A.; DE MORAES, A.V.; HIGUCHI, M.L.; BARBERO-MARCIAL, M.; SOSA, E.; et al. *In vivo* detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **Am Heart J**, v. 131, n. 2, p. 301-307, 1996.

- BENDECK, M.P. Macrophage matrix metalloproteinase-9 regulates angiogenesis in ischemic muscle. **Circ Res**, v. 94, n. 2, p. 138-139, 2004.
- BENZIGER, C.P.; DO CARMO, G.A.L.; RIBEIRO, A.L.P. Chagas cardiomyopathy clinical presentation and management in the Americas. **Cardiol Clin**, v. 35, n.1, p. 31-47, 2017.
- CAMPOS, M.C.O.; LEON, L.L.; TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Mol Biochem Parasitol**, v. 193, n. 1, p. 17-19, 2014.
- CHOI, P.; Reiser, H. IL-4: role in disease and regulation of production. **Clin Exp Immunol**, v. 113, n.13, p. 317-319, 1998.
- CUCUNUBÁ, Z.M.; OKUWOGA, O.; BASÁÑEZ, M.G.; NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasit Vectors**, v.9, n.42, p. 1-13, 2016.
- DE ARAUJO, T.H.; OKADA, S.S.; GHOSN, E.E.; TANIWAKI, N.N.; RODRIGUES, M.R.; DE ALMEIDA, S.R.; et al. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. **Cell Immunol**, v. 281, n.1, p. 27-30, 2013.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n.3, p. 734-747, 2012.
- FILIGHEDDU, M.T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J.M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Med Clin**, v. 148, n. 3 p. 125-131, 2017.
- FRANCO, M.F. Experimental carditis induced by *Trypanosoma cruzi* (y strain) in guinea pigs: correlation between histopathology and the presence of *T. cruzi* antigens identified by indirect immunofluorescence. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, n.3, p. 187-189, 1990.
- FRANCO- PAREDES, C.; BOTTAZI, M.E.; HOTEZ, P.J. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, n. 7, p.e470, 2009.
- GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chaga's disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n.4, p. 1521-1528, 2005.
- HALL, B.F.; WEBSTER, P.; MA, A.K.; JOINER, K.A.; ANDREWS, N. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J Exp Med**, v. 176, n. 2, p. 313-325, 1992.
- HIGUCHI, M.L.; DE BRITO, T.; MARTINS-REIS, M.; BARBOSA, A.; BELLOTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v. 2, n. 2, p. 101-106, 1993.
- JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348-357, 1993.

KAHN, S.; WLEKLINSKI, M.; ARUFFO, A.; FARR, A.; KAHN, M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. **J Exp Med**, v.182, n. 5, p. 1243-1258, 1995.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MARTINS, R.M.; ALVES, R.M.; MACEDO, S.; YOSHIDA, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 7, p. 943-954, 2011.

MAEDA, F.Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front Immunol**, v. 3, p. 1-7, 2012.

MARINHO, C.R.; BASTOS, K.R.; SARDINHA, L.R.; GRISOTTO, M.G.; LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. Challenge of *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice with trypomastigotes activates the immune system and reduces subpatent parasitemia levels. **J Parasitol**, v. 90, n. 3, p. 516-523, 2004.

MEJIA, A.M.; HALL, B.S.; TAYLOR, M.C.; GÓMEZ-PALACIO, A.; WILKINSON, S.R.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; KELLY, J.M. Benzimidazole-Resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **J Infect Dis**, v.206, n. 2, p. 220-228, 2012.

PEREIRA-NUNES, M.C. DONES, W.; MORILLO, C.A.; ENCINA, J.J.; RIBEIRO, A.L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n.9, p. 767-776, 2013.

ROBERTS, D.M.; KEARNEY, J.B.; JOHNSON, J.H.; ROSENBERG, M.P.; KUMAR, R.; BAUTCH, V.L. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1531-1535, 2004.

RODRIGUES, A.A.; SAOSA, J.S.; DA SILVA, G.K.; MARTINS, F.A.; DA SILVA, A.A.; SOUZA NETO, C.P.; et al. IFN- $\gamma$  Plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, e1598, 2012.

RODRIGUES, A.A.; CLEMENTE, T.M.; DOS SANTOS, M.A.; MACHADO, F.C.; GOMES, R.G.B.; MOREIRA, H.H.T.; et al. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**, v.7, p.e51384, 2012.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.J.; PADILLA, A.; WANG, W.; ORR, D.; TARLETON, R.L. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure, **eLife**, v. 7, p. e34039, 2018.

SABINO, E.C.; RIBEIRO, A.L.; LEE, T.H.; OLIVEIRA, C.L.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; ANTUNES, A.P.; et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. **Eur J Heart Fail**, v. 17, n. 4, p. 416-423, 2015.

SILVA, C.V.; KAWASHITA, S.Y.; PROBST, C.M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M.C.; DA SILVA, E.A.; et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infect**, v. 11, n. 5, p. 563-570, 2009.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, p. 295394, 2010.

SUGIYAMA, S.; OKADA, Y.; SUKHOVA, G.K.; VIRMANI, R.; HEINECKE, J.W.; LIBBY, P. Macrophage Myeloperoxidase Regulation by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Atherosclerosis and Implications in Acute Coronary Syndromes. **Am J Pathol**, v. 158, n. 3, p. 879-891, 2001.

TEIXEIRA, S.C.; LOPES, D.S.; GIMENES, S.N.C.; TEIXEIRA, T.L.; SILVA, M.S.; BRÍGIDO, R.T.S.; et al. Mechanistic insights into the antiangiogenic activity of *Trypanosoma cruzi* protein 21 and its potential impact on the onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Sci Rep**, v. 21, p. 44978, 2017.

TEIXEIRA, T.L.; MACHADO, F.C.; SILVA, A.A.; TEIXEIRA, S.C.; BORGES, B.C.; DOS SANTOS, M.A.; et al. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci Rep**, v. 5, p. 16877, 2015.

TEIXEIRA, T.L.; CASTILHOS, P.; RODRIGUES, C.C.; SILVA, A.A.; BRÍGIDO, R.T.S.; TEIXEIRA, S.C.; et al. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. **Micro Pathog**, v.135, p. 103618, 2019.

WHO. **World Health Organization/ Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>, acesso em 20/03/2020.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Ciênc**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

## EFEITOS DA SINALIZAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR *Trypanosoma cruzi* NA PATOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Marina Ferreira Batista<sup>1</sup>, Isabela Meneghelli<sup>1</sup>, Diana Bahia<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Evolução e Ecologia, Programa de Pós-graduação em Genética, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

Durante o processo de interação parasita-hospedeiro a comunicação celular é estabelecida de forma que o hospedeiro possa reconhecer e responder a determinado estímulo do patógeno. Assim, temos o envolvimento de várias vias de sinalização celular que, ao responderem a estímulos variados, podem gerar desde respostas imediatas até respostas mais lentas e longas. *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas, é um parasito de biologia complexa e diversa; suas diferentes cepas e formas morfológicas levam à ativação diferenciada das vias celulares do hospedeiro. Dentre as vias mais estudadas, nós destacamos a via de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK), a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/AKT e a via Fator Nuclear kappa B (NFkB). MAPK é amplamente estudada como reguladora da resposta imune do hospedeiro e se relaciona tanto à resposta imune inata quanto adaptativa quando patógenos entram em contato com a célula hospedeira. PI3K tem papel na regulação de processos celulares relacionados à crescimento e migração. NFkB é importante no desenvolvimento de células do sistema imune e na formação de respostas inflamatórias. Neste capítulo, faremos uma breve revisão de como essas vias estão envolvidas no processo de infecção por *T. cruzi* e como influenciam no desenvolvimento da doença de Chagas.

**Palavras-chaves:** Doença de Chagas, Proteínas quinases e Sinalização celular.

### ABSTRACT

During host-parasite interaction process, cellular communication is established in a manner that the host can recognize and respond to a particular pathogen stimulus. Several cell signalling pathways are thus engaged to responding diverse stimuli, which can generate from immediate to slower gradual responses. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, is a parasite with a complex and diverse biology; its different strains and morphological forms lead to distinct activation of host's cellular pathways. Among the most studied pathways, we highlight the Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT and the Nuclear Factor kappa B (NFkB) pathways. MAPK is widely studied as a regulator of the host immune response and is related to both innate and adaptive immune responses against pathogens. PI3K presents a role in regulating intracellular processes related to growth and migration. NFkB is important during

immune cells development and in the regulation of inflammatory responses. In this chapter, we will briefly review how these pathways are involved in *Trypanosoma cruzi* infection process and how they influence the development of Chagas' disease.

**Key-words:** Chagas disease, Protein kinases, Cellular signaling.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC), descoberta em 1909 pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (CHAGAS, 1909), compõe, atualmente, o quadro de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 2019a). De acordo com dados recentes da OMS, estima-se que existem oito milhões de pessoas contaminadas com *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em escala mundial, sendo a doença de Chagas endêmica em 21 países da América Latina, exceto nas Ilhas do Caribe (OMS, 2019b). Essa doença, assim como muitas outras causadas por tripanossomatídeos, atinge, principalmente, populações de baixo poder aquisitivo e socialmente segregadas. No entanto, o perfil de infecção por *T. cruzi* tem sido expandido a diferentes populações devido ao alto fluxo de circulação de pessoas entre continentes, levando a novos contextos epidemiológicos, econômicos e sociais na distribuição da doença (OMS, 2019b).

A DC se manifesta em diferentes formas clínicas: aguda, crônica cardíaca e gastrointestinal, e crônica indeterminada: Na fase aguda, caracterizada pela presença de formas circulantes na corrente sanguínea, há intensa resposta inflamatória e ativação da resposta imune inata, com consequente produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Já a fase crônica, é caracterizada por inflamação local e lesão tecidual, resultante da ação citotóxica de células T CD8+, e pode gerar cardiopatias e mega síndromes (esôfago e intestino) ou pode ser indeterminada, na qual não causa a patogênese previamente descrita, onde há regulação da resposta imune pela produção de citocinas regulatórias IL-10 e IL-17 (revisado por PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Neste capítulo, faremos uma breve revisão de como essas vias estão envolvidas no processo de infecção por *T. cruzi* e como influenciam no desenvolvimento da doença de Chagas.

## 1.2. *Trypanosoma cruzi*, O AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

*Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (BRENER, 1997), representa o agente etiológico da doença de Chagas. *T. cruzi* parasita tanto hospedeiros mamíferos quanto insetos hemípteros da família Reduviidae e subfamília Triatominae (ex. *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*) durante seu complexo ciclo de vida (BRENER, 1997; JORGE; CASTRO, 2000; OPAS, 2009). No hospedeiro invertebrado, são encontradas as formas epimastigotas (EPI) – intestino médio (replicativa) – e tripomastigotas metacíclicos (TM) – intestino distal (infectiva). *T. cruzi* é considerado um patógeno intracelular obrigatório presente nas formas amastigotas intracelulares (AI) (replicativa) e tripomastigotas sanguíneos (TS) (infectiva) no hospedeiro vertebrado (mamífero) (CLAYTON, 2010; BERN, 2015;). Formas liberadas pela eclosão precoce de células ou por diferenciação de formas TS circulantes, denominadas amastigotas extracelulares (AEs), também tem capacidade de invadir células e manter a infecção, revisado por Mortara et al. (1999) e Ferreira et al. (2012). *T. cruzi* se adapta a diferentes ambientes aos quais tem contato durante seu complexo ciclo de vida. Este protozoário apresenta alta diversidade genética (ex. variação em número de cromossomos) entre cepas/clones específicos, favorecendo genótipos e fenótipos fundamentais a sua adaptação no hospedeiro, o que confere a esse organismo níveis distintos de plasticidade genética entre suas cepas (REIS-CUNHA et al., 2015; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018). Devido a sua variedade de genótipos e fenótipos, *T. cruzi* é classificado em diferentes grupos (Tc I a VI e Tcbat - TcVII), denominados DTUs (do inglês, *Discrete typing unit*), os quais também abrangem características epidemiológicas e patogênicas do parasita (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013; LIMA et al., 2015).

## 1.3. PATÓGENO-HOSPEDEIRO: INTERAÇÃO NA RESPOSTA CELULAR

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas no processo de resposta celular mediante uma infinidade de estímulos. Essas respostas podem levar ou não à ativação e modulação da atividade gênica no hospedeiro (ALBERTS et al., 2006). O estabelecimento de uma comunicação celular eficiente é fundamental para que o hospedeiro consiga traduzir aquela mensagem recebida e diferenciar o tipo de resposta de acordo aquele estímulo (ALBERTS et al., 2006). Sabe-se que diferentes microrganismos, sejam eles patogênicos

ou não, são capazes de induzir respostas celulares específicas que definirão o curso dos mesmos, quando em contato com um dado hospedeiro (MOYES et al., 2010; BLANDER; SANDER, 2012; BAHIA; SATOSKAR; DUSSURGET, 2018).

No entanto, muitos patógenos, principalmente os intracelulares obrigatórios, desenvolvem estratégias para burlar os sistemas de respostas do hospedeiro, visando sua própria sobrevivência, sendo fundamental para o desenvolvimento da doença (CASADEVALL, 2008; BAHIA; SATOSKAR; DUSSURGET, 2018). Durante o processo de entrada e permanência de *T. cruzi*, um parasita intracelular obrigatório, diferentes vias celulares são ativadas resultando em respostas celulares específicas podendo essa interação patógeno-hospedeiro ser estabelecida através de uma infinidade de moléculas, tanto do parasita quanto do hospedeiro (revisado por BONFIM-MELO *et al.*, 2015). Ainda, a propagação do sinal emitido (pelo patógeno) no hospedeiro é dada por especificidade de interação proteína-proteína e por meio de proteínas adaptadoras, componentes fundamentais na eficiência na ativação de cascatas de fosforilação processuais e direcionadas durante o processo de sinalização celular (CHANG; KARIN, 2001; BARDWELL, 2006).

Proteínas quinases (PK, do inglês *Protein Kinase*), são proteínas que apresentam papel fundamental nesses processos sequenciais de fosforilação. Essas proteínas catalisam a reação de adição de grupamentos fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) de moléculas doadoras de alta energia, como adenosina trifosfato (ATP), a outras proteínas, processo denominado fosforilação, modificando sua estrutura alostérica e, conseqüentemente, seu estado funcional. Esse processo pode ser revertido por proteínas denominadas fosfatases que retiram esses grupamentos (desfosforilação) (HANKS; QUINN; HUNTER, 1988; WANG; COLE, 2015).

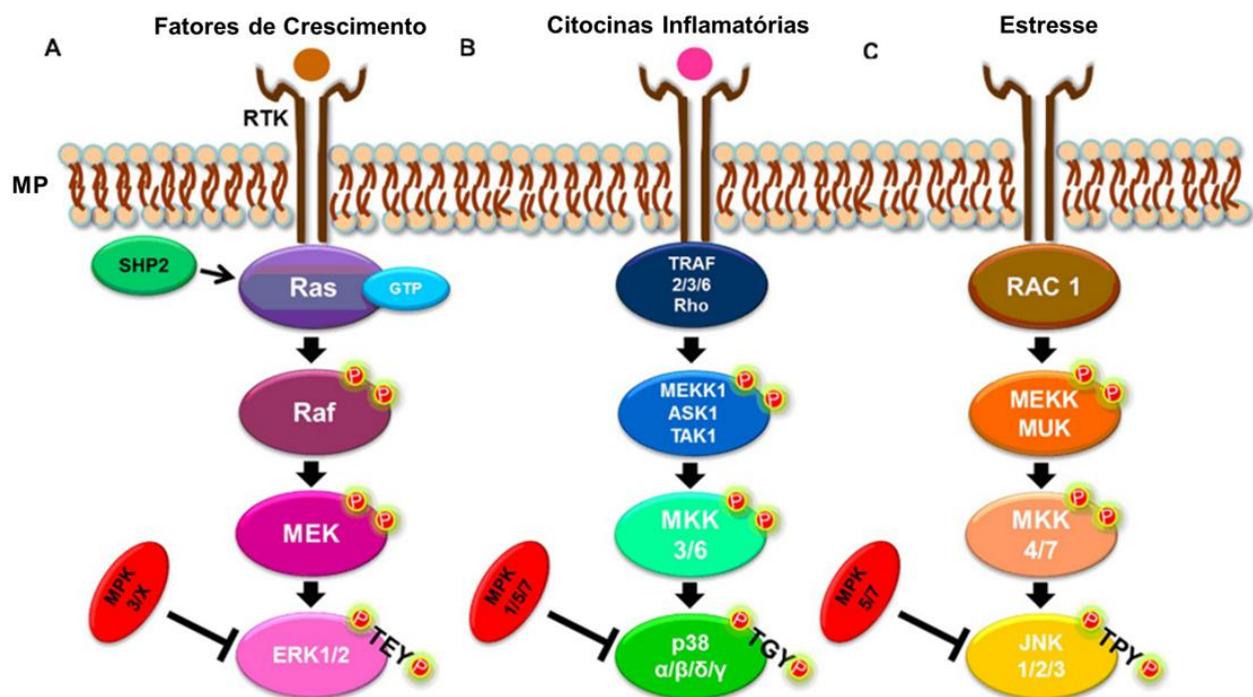
#### 1.4. CASCATAS DE SINALIZAÇÃO TRANSDUTORAS DE SINAIS: ENZIMAS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO DE COMUNICAÇÃO CELULAR

##### 1.4.1 Via de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein kinases*)

MAPK é uma família de proteínas serina/treonina quinases (MANNING, 2002), altamente conservadas desde organismos unicelulares a organismos mais complexos como humanos (MODY; WEINER; RAMANATHAN, 2009), capazes de induzir a ativação

de diversas respostas celulares através da conversão de estímulos externos. Proteínas quinases pertencentes a essa via estão envolvidas em diversos processos de sinalização celular, como expressão gênica, resposta à estresse, apoptose, resposta imune e proliferação (RAMAN; CHEN; COBB, 2007; CARGNELLO; ROUX, 2011).

A transdução de sinais externos mediada por MAPK culmina no desencadeamento de uma série de estímulos consecutivos (Figura 1A, B e C), uma MAPK3 ativa a MAPK2 (MEK1/2; MKK3/6; MKK4/7) que leva à ativação de uma posterior MAPK (ERK1/2; p38; JNK1/2) (KUMAR; BOEHM; LEE, 2003; KOLCH, 2005).



**Figura 1.** Via de sinalização de MAPK simplificada.

A) Via de quinases reguladas por estímulos extracelulares (ERK1/2); B) Quinases c-Jun amino N -terminal 1/2/3 (JNK1/2/3); C) p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ). SHP2, MPK 3/X, MPK 1/5/7, MPK5/7: Fosfatases. P: Fosforilação. TEY, TGY, TPY: Sítios de fosforilação. RTK: Receptor tirosina quinase. MP: Membrana plasmática. Fonte: Adaptada de Soares-Silva et al. (2016).

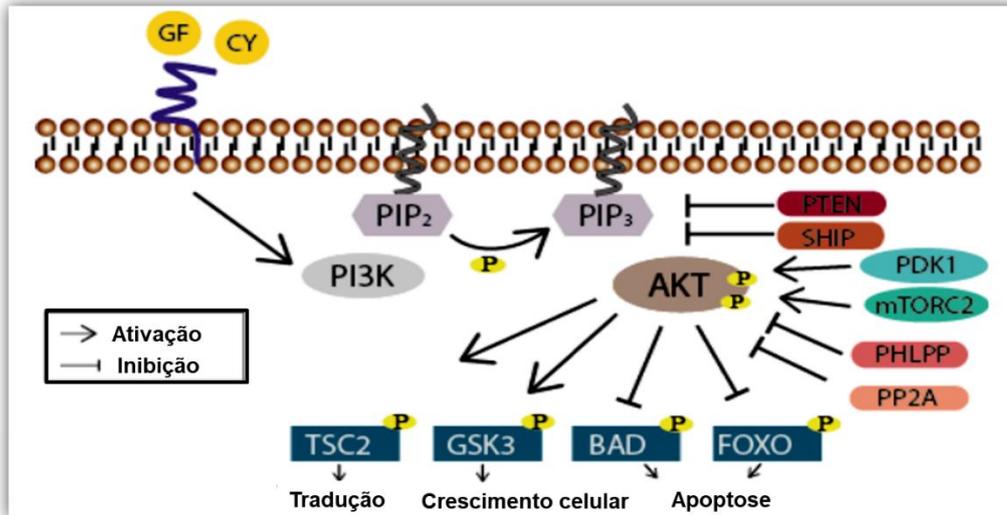
Essa interação de proteínas leva à ativação e translocação de quinases para o núcleo e conseqüente controle da expressão gênica, através da modificação do estado de fosforilação de fatores de transcrição (ativação e formação de dímeros), regulação da estabilidade de mRNA (fosforilação de proteínas ligadas a ele), remodelamento da

cromatina (proteínas a jusante MSK e RSK), e agem, também, como co-ativadoras e inibidoras (retenção citoplasmática de fatores de transcrição) (; KOLCH, 2005; TURJANSKI; VAQUÉ; GUTKIND, 2007).

#### **1.4.2 Via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/AKT**

As proteínas fosfatidilinositol-3-quinases (PI3Ks) são membros de uma família conservada de quinases lipídicas que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositóis e fosfatidilinositídeos. Esses fosfatidilinositídeos coordenam a localização e função de várias proteínas efetoras, que se ligam a esses lipídios, produtos da ação das PI3Ks, através de domínios específicos, sendo, dessa forma, ativadas pela ação das PI3Ks. A sinalização por PI3Ks contribui para vários processos intracelulares, como o crescimento celular, sobrevivência e migração, além do transporte de vesículas. As isoformas de PI3K são divididas em três classes (I, II e III) de acordo com sua estrutura e substrato lipídico (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; VANHAESEBROECK et al., 2010).

Grande parte do que conhecemos sobre a transdução de sinal das PI3Ks é baseado nos estudos sobre as PI3Ks de classe I, e é também essa classe a que está associada à via PI3K/AKT/mTOR. Os fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatos (PIP<sub>3</sub>), fosforilados pelas PI3Ks de classe I, funcionam como segundo mensageiro e ativam diversas moléculas na via. Um dos principais alvos dos PIP<sub>3</sub> é a proteína AKT/proteína quinase B (PKB), uma serina/treonina quinase (Figura 2). Ao se ligar aos PIP<sub>3</sub> ela é recrutada para membrana onde é fosforilada por mTOR2 (Ser473) e depois por PDK (Thr308). Uma vez fosforilada por mTOR2 e PDK, AKT é totalmente ativada e é capaz de fosforilar diversas proteínas alvo, amplificando o sinal inicial (MANNING; TOKER, 2017). Entre os processos celulares regulados por essa via estão a sobrevivência, proliferação, crescimento e metabolismo (ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2012).



**Figura 2.** Esquema da via de PI3K/Akt. A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é ativada através da ligação de fatores de crescimento (GF) ou citocinas (CY) aos receptores RTKs ou receptores GPCR (linha azul lateral), resultando na fosforilação de PIP2. O PIP3 resultante funciona como um segundo mensageiro, permitindo a ligação de proteínas como Akt. Assim, este último sofre alterações conformacionais, levando a sua fosforilação e ativação por mTORC2 e PDK1. Dessa forma, Akt participa da regulação de processos celulares, como tradução, crescimento celular e apoptose, fosforilando outras proteínas. O término da cascata de sinalização pode ocorrer através da desfosforilação de PIP3 pela fosfatase PTEN ou SHIP, ou ainda através da desfosforilação de Akt por PHLPP ou PP2A. Fonte: Adaptada de Diehl e Schaal (2013).

### 1.4.3. Via fator nuclear kappa B (NFκB)

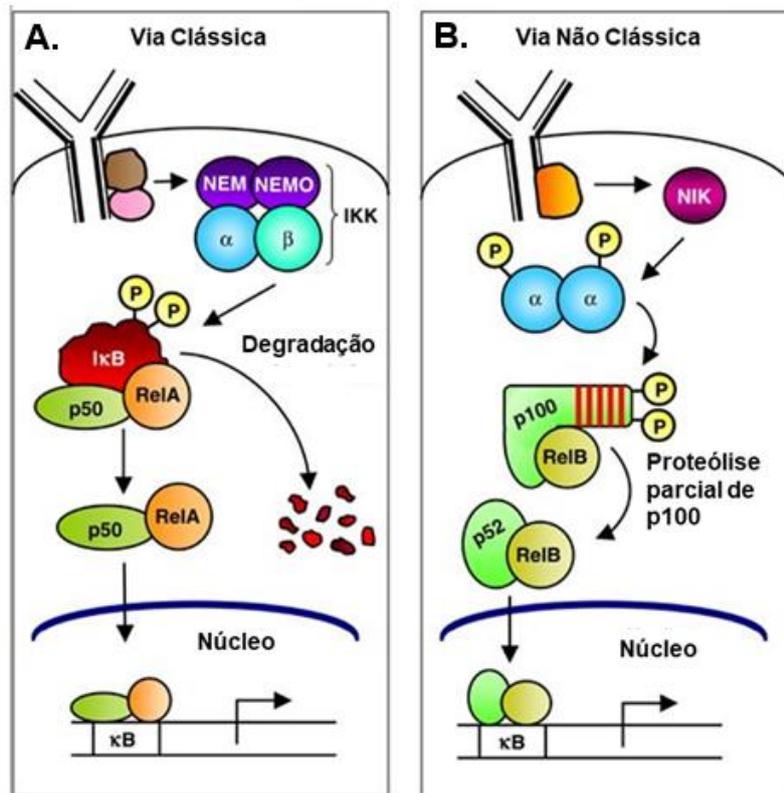
A via NFκB é ativada mediante diversos estímulos como padrões de reconhecimento moleculares (PAMPs) (ex. LPS), estresse (estímulos ribotóxicos e genotóxicos) e citocinas (TNF-α e IL-1), desencadeando uma cascata de sinalização citoplasmática. O estímulo de NFκB está relacionado à resposta imune e inflamação, proliferação celular e apoptose (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009; MITCHELL; VARGA; HOFFMAN, 2016).

NFκB é um complexo protéico citoplasmático composto por cinco proteínas monoméricas que podem se agrupar e formar homodímeros ou heterodímeros: p65/RelA, RelB, cRel, p50, e p52, que, apresentam capacidade de ligação ao DNA (MITCHELL; VARGA; HOFFMAN, 2016).

Na sua forma canônica (Figura 3.A) de sinalização, duas principais subunidades, p65 (RelA) e p50 (NFκB1), e moléculas inibitórias da família IκB, formam um complexo citoplasmático inativo. A via NFκB, mediante um estímulo inflamatório, é estimulada pelo complexo IKK, constituído por duas quinases, IKKα e IKKβ, e uma subunidade regulatória e não catalítica, denominada NEMO. O complexo, em sua forma ativa, fosforila a

subunidade alfa do inibidor (I $\kappa$ B) de NF $\kappa$ B. I $\kappa$ B, então, se desprende do dímero p65/p50 e é direcionado à degradação, ativando o complexo NF $\kappa$ B que migra para o núcleo celular e funciona como fator transcrricional nuclear, induzindo a transcrição de genes inflamatórios específicos (LAWRENCE, 2009; BALDWIN, Jr., 1996).

Já na sua forma não canônica de ativação (Figura 3.B), NF $\kappa$ B independe do complexo NEMO-IKK, mas requer a participação da quinase indutora de NF $\kappa$ B (NIK) e IKK $\alpha$  levando à fosforilação do complexo p100/RelB e consequente processamento de p100 a p52, induzindo, assim, a migração de NF $\kappa$ B. Essa via está relacionada, principalmente, a estímulos de maturação em células B e T (MITCHELL; VARGA; HOFFMAN, 2016; GILMORE, 2006).



**Figura 3.** Vias de transdução de sinal NF- $\kappa$ B. A. Na via clássica de NF- $\kappa$ B, dímeros de NF- $\kappa$ B como p50/RelA são mantidos no citoplasma por interação com uma molécula de I $\kappa$ B independente.

Em muitos casos, a ligação de um ligante a um receptor da superfície recruta para o domínio citoplasmático do receptor. Por sua vez, esses adaptadores geralmente recrutam um complexo IKK (contendo as subunidades catalíticas  $\alpha$  e  $\beta$  e o dímero regulatório NEMO) diretamente para os adaptadores citoplasmáticos. Esse agrupamento de moléculas no receptor ativa o complexo IKK. IKK fosforila I $\kappa$ B, o que leva a sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma. Dessa forma, NF- $\kappa$ B entra no núcleo para ativar os genes alvo. B. A via não clássica é amplamente utilizada para a ativação de complexos p100/RelB durante o desenvolvimento de órgãos das células B e T. Na via não clássica, a ligação ao receptor leva à ativação da quinase NIK indutora de NF- $\kappa$ B, que fosforila e ativa um complexo IKK $\alpha$ , que por sua vez fosforila p100, levando à sua proteólise parcial e liberação do complexo p52/RelB que se desloca para o núcleo. Fonte: Adaptada de Gilmore (2006).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ATIVAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULARES NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* - “REPERCUSSÕES NA PATOLOGIA CHAGÁSICA”

#### 2.1.1. Doença de Chagas e via MAPK

A ativação de algumas proteínas pertencentes à MAPK por *T. cruzi* já foi proposta em células endoteliais, cardíacas e do sistema nervoso (CHUENKOVA; PEREIRA, 2001; MUKHERJEE et al, 2004). MAPKs vêm sendo amplamente estudadas no contexto de regulação de respostas imunes e está relacionada tanto à resposta imune inata quanto adaptativa, mediante a interação com patógenos (RUB et al., 2009; MOYES et al., 2010; CHAKRABORTY et al., 2015).

Há evidências de que *T. cruzi* utilize de estratégias no direcionamento da resposta imune do hospedeiro para manutenção da infecção (BASSO, 2013). No entanto, a forma como *T. cruzi* modula a resposta imune do hospedeiro para manter a infecção, agindo sobre as vias de sinalização das MAPKs, não é vastamente estudada e totalmente compreendida. Sabe-se que *Leishmania* spp., também um protozoário da família Trypanosomatidae, evade a resposta imune do hospedeiro, atuando sobre a via CD40/MAPK. *Leishmania* impede a realocação de CD40, fator co-estimulatório de células T subtipo Th1, para a membrana plasmática para modular a sinalização CD40/MAPK de p38 para ERK1/2, subvertendo a produção de citocinas regulatórias de IL-12 para IL-10, impedindo a formação da resposta do tipo Th1 e favorecendo a infecção por meio do estabelecimento de uma resposta do tipo Th2. *Leishmania* também induz aumento na produção de IL-10, atuando sobre fosfatases (MKP-1 e MKP-3). O direcionamento da resposta imunológica para o tipo Th2 leva à produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-9, voltadas para a eliminação de patógenos extracelulares, sendo ineficiente no combate do parasito em questão (revisado por SOARES-SILVA et al., 2016).

A relevância de ERK1/2 na invasão de *T. cruzi* já havia sido previamente demonstrada por Magdesian e colaboradores (2007) que avaliaram a relação do domínio FLY, conservado dentro da superfamília de proteínas trans-sialidase Gp85 presentes na superfície de formas tripomastigotas, durante o processo de invasão de *T. cruzi* em fibroblastos. Esse domínio encontrado em proteínas trans-sialidases é importante durante

o processo de adesão e entrada desses parasitos em células epiteliais. Os autores desse estudo citado demonstraram que tripomastigotas induzem a ativação da MAPK ERK como forma de favorecimento da internalização durante o processo infectivo e que essa quinase, uma vez inibida, bloqueia a adesão de FLY na célula e inibe a invasão desses parasitos (MAGDESIAN et al., 2007).

A MAPK p38 também já foi descrita como envolvida na infecção por *T. cruzi* sendo esta inibida por mucinas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasito que, dessa forma, impede a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-12 pela célula hospedeira, prejudicando a formação de uma resposta imune eficiente (ALCAIDE; FRESNO, 2004). Foi sugerido ainda por Terrazas et al. (2011) que p38 estaria associada a uma maior resistência a infecção por tripomastigotas de *T. cruzi*, quando ativada pelo fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) em células dendríticas (TERRAZAS et al., 2011).

O contato de AEs da cepa G leva a um aumento na fosforilação de ERK1/2 e a inibição dessa quinase causa uma redução no número de parasitas internalizados, provavelmente isso se deve ao papel de ERK 1/2 nos processos de remodelamento do citoesqueleto da célula (BONFIM-MELO et al., 2015; FERREIRA et al., 2019). Foi observado pelo nosso grupo de pesquisa, em dados em preparo ainda não publicados que, além da ativação ERK1/2, o perfil de fosforilação induzido diverge entre a AEs da cepa G e da cepa CL, sendo a primeira cepa mais infectiva em relação a segunda nesta forma. Enquanto AEs da cepa CL apresentam uma ativação de ERK1/2 com um declínio nos tempos finais de internalização de *T. cruzi*, AEs da cepa G induzem uma ativação caracteristicamente bifásica, em que há um aumento seguido de um declínio e um aumento futuro, e um segundo declínio, durante o curso da infecção. Acredita-se que esse perfil de sinalização está ligado a uma maneira do sistema imune distinguir as respostas induzidas por patógenos e identificar se aquele microrganismo é patogênico ou um comensal, como já foi visto para organismos como *Candida albicans* (Ascomycota, Debaryomycetaceae) (MOYES et al., 2010) e que poderia ser uma forma de *T. cruzi* da cepa G subverter o sistema imune e dar continuidade a patologia.

### **2.1.2. Doença de Chagas e via PI3K-AKT**

Diferentes estudos evidenciam que a via PI3K/AKT é ativada durante a internalização de *T. cruzi* em diferentes tipos celulares (FERREIRA, et al., 2019; SUMAN et al., 2018; FERNANDES et al., 2006; WILKOWSKY et al., 2001; CHUENKOVA et al., 2001). Ainda,

diferentes inibidores do eixo PI3K-AKT vêm sendo testados, “*in vitro*” e “*in vivo*”, como potenciais tratamentos para o controle da doença de Chagas (DIAZ-GONZALEZ et al., 2011).

Wilkowsky (2001), utilizando uma cepa altamente letal (RA), observou que formas tripomastigotas apresentavam papel fundamental na internalização desses em células, uma vez que a utilização de inibidores específicos para a via PI3K reduz significativamente a taxa de infecção “*in vitro*” (WILKOWSKY et al., 2001). Em estudo posterior, Silva et al. (2018) confirmou que, em infecções com formas tripomastigotas (cepa Y), a via PI3K/AKT parece apresentar papel de proteção durante a patologia da Doença de Chagas, uma vez que animais deficientes em PI3K gama (PI3K classe I) apresentaram maior perda de peso e maior dano no tecido cardíaco, além de um maior tropismo parasitário nesse órgão (SILVA et al., 2018).

Além disso, já foi demonstrado, em estudos realizados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Sylvio, que trans-sialidases do parasita são responsáveis pela ativação da via de PI3K/Akt, desencadeando uma resposta anti-apoptótica em células nervosas a fim de evitar danos teciduais e dessa forma sobreviver no ambiente intracelular (CHUENKOVA et al., 2001; CHUENKOVA; PEREIRAPERRIN, 2009). Esse efeito também foi observado por AOKI et al. (2006) em tecidos cardíacos onde os autores relacionam a ativação de PI3K-AKT e sua atividade anti-apoptótica ao fator de virulência cruzipaina, uma cisteína peptidase secretada por *T. cruzi* (AOKI et al., 2006).

As formas AEs de *T. cruzi* também tem capacidade de ativação da via PI3K/ Akt, como foi observado por Ferreira et al. (2019). Além de demonstrarem a ativação de PI3K/ Akt, o uso de inibidores específicos dessa via reduziu significativamente o número de parasitos internalizados. A ativação dessa via se dá pela necessidade de reorganização do citoesqueleto que envolve a entrada dessa forma do parasito em células epiteliais (FERREIRA et al., 2019).

### **2.1.3. Doença de Chagas e via NFkB**

NFkB age como fator transcricional nuclear direcionando a produção de citocinas/interleucinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 e IL-6, IFN (GILMORE, 2006; OECKINGHAUS; GHOSH, 2009; BLANDER; SANDER, 2012; NENNIG; SCHANK, 2017). Ahmed e colaboradores (2006) mostraram em células resistentes à radiação, por meio de experimentos de co-localização de p65 e MEK, que essas proteínas interagem, causando

inibição da formação e translocação do complexo p65/ERK para o núcleo. Esse autor sugere que o efeito inibitório dessa proteína pode levar a um aumento de sobrevivência celular (AHMED et al., 2006).

Huang et al. (1999) apontaram a importância da ativação da via de NF-κB durante a invasão de *T. cruzi* da cepa de Tulahen. Nesse estudo, os autores destacam que a invasão pelo parasito ativa a via de NFκB, fazendo com que a células endoteliais expressem moléculas de adesão e, ainda, favorece a formação de uma resposta inflamatória que leva a dano vascular e disfunção tecidual (HUANG et al., 1999). Por outro lado, Hall e colaboradores (2000) observaram um papel protetor na ativação de NFκB por *T. cruzi* de três cepas distintas em células epiteliais. No mesmo trabalho, o fato desse parasito não ativar a via NFκB em células do músculo cardíaco é apontado como um dos fatores associados ao tropismo tecidual típico da doença de Chagas (HALL et al., 2000).

Posteriormente, foi demonstrado por Petersen e colaboradores (2006), o papel de NFκB, não na formação de uma resposta inflamatória, mas na proteção contra a apoptose de células cardíacas, favorecendo o estabelecimento da infecção por parasitos da cepa Y (PETERSEN et al., 2006). A ativação de NFκB se mostrou favorável à invasão de parasitos da mesma cepa, quando induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF) em duas linhagens de células epiteliais (PINTO et al., 2011).

Hovsepian e colaboradores (2013) observaram que *T. cruzi* tem a capacidade de regular positivamente SOCS-3 (supressor da sinalização de citocinas 3), através das fosforilação de STAT-3 (do inglês: *signal transducers and activators of transcription*) impedindo a translocação de NFκB para o núcleo. Com isso, o parasito impede a formação de uma resposta inflamatória adequada (HOVSEPIAN et al., 2013).

No entanto, quando Bott e colaboradores (2018) avaliaram a ação de lipídios das formas AEs de *T. cruzi* das cepas RA e K98, observaram que esses componentes são capazes de ativar NFκB através da ativação dos receptores Toll-like 2 e 6 e levar a uma resposta inflamatória em células HEK (BOTT et al., 2018).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas vias de sinalização estão envolvidas nos diferentes processos de comunicação celular. Dentre eles, a interação patógeno-hospedeiro é fundamental para

que uma resposta seja estabelecida por meio do hospedeiro, uma vez perturbada sua homeostase celular. Assim, uma importante estratégia utilizada por diferentes patógenos para sua manutenção é através da modulação da resposta celular do hospedeiro. *T. cruzi*, como um patógeno intracelular obrigatório, subverte diferentes vias de sinalização, como aqui discutidas, durante os processos de internalização e manutenção no hospedeiro. A interferência do funcionamento de vias do hospedeiro, através da utilização de drogas inibidoras, tem sido fundamental para demonstrar a importância dessas na busca de novos tratamentos, já que o patógeno intracelular depende dessas vias para poder se estabelecer e proliferar. Dessa forma, a compreensão da relação patógeno-hospedeiro é de extrema importância no controle de diversas doenças, principalmente em organismos intracelulares obrigatórios, polimórficos e de alta complexidade como *T. cruzi*.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AHMED, K.M.; S. DONG; M. FAN; J. J. LI. Nuclear Factor- B p65 Inhibits Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Radioresistant Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 12, p. 945–955, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Mecanismos de comunicação celular**. 5ª ed, Artmed, 2006.
- ALCAIDE, P.; FRESNO, M. AgC10, a mucin from *Trypanosoma cruzi*, destabilizes TNF and cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1695–1704, 2004.
- AOKI, M.P.; CANO, R.C.; PELLEGRINI, R.C.; TANOS, T.; GUIÑAZÚ, L.; COSO, O.A.; GEA, SUSANA. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1723-1731, 2006.
- BAHIA, D.; SATOSKAR, A.R.; DUSSURGET, O. Cell Signaling in Host–Pathogen Interactions: The Host Point of View. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 221, 2018.
- BARDWELL, L. Mechanisms of MAPK signalling specificity. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 5, p. 837–841, 2006.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BLANDER, J.M; SANDER, L.E. Beyond pattern recognition: Five immune checkpoints for scaling the microbial threat. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 215–225, 2012.

- BONFIM-MELO, A. et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1797–1810, 2015.
- BOTT, E.; CARNEIRO, A. B.; GIMENEZ, G.; LÓPEZ, M. G.; LAMMEL, E. M.; ATELLA, G. C.; et al. Lipids From *Trypanosoma cruzi* amastigotes of RA and K98 strains generate a pro-inflammatory response via TLR2/6. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 2018.
- BRENER, Z. ***Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo***. Scielo Books, p. 24– 31, 1997.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n. 1, p. 50–83, 2011.
- CASADEVALL, A. Evolution of Intracellular Pathogens. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 62, p. 19-33, 2008.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- CHAKRABORTY, S.; SRIVASTAVA, A. JHA, M.K.; NAIR, A.; PANDEY, S.P.; SRIVASTAVA, N.; et al. Inhibition of CD40-Induced N-Ras Activation Reduces *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v.194, .8, p.3852-3860, 2015.
- CHANG, C.-F.; et al. Polar Opposites: Erk Direction of CD4 T Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 721–731, 2012.
- CHUENKOVA, M.V.; PEREIRA, M.A. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. **NeuroReport**, v. 12, n. 17, p. 3715–3718, 2001.
- CHUENKOVA, M. V.; FURNARI, F. B.; CAVENEE, W. K.; PEREIRA, M. A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: A potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n.17, p. 9936-9941, 2001.
- CHUENKOVA, M. V.; PEREIRAPERRIN, M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. **Science Signaling**, v. 2, n. 97, p. 1- 10, 2009.
- COHEN, P. Protein kinases - the major drug target of twenty century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 309-315, 2002.
- DAS, V.; KALYAN, G.; HAZRA, S.; PAL, M. Understanding the role of structural integrity and differential expression of integrin profiling to identify potential therapeutic targets in breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 168–185, 2018.
- DIAZ-GONZALEZ, R.; KUHLMANN, M. F.; GALAN-RODRIGUEZ, C.; DA SILVA, L. M.; SALDIVIA, M.; KARVER, C. E.; et al. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1297, 2011.
- DIEHL, N.; SCHAAL, H. Make yourself at home: Viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3192-3212, 2013.

- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301 SUPPL., p. 2009–2010, 2010.
- ENGELMAN, A. J.; LUO, J.; CANTLEY, C. L. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.
- ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1946-1954, 2015.
- FERNANDES, A. B.; NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: Studies on signaling pathways. **Parasitology Research**, v. 100, n.1, p. 59-68, 2006.
- FERREIRA, É. R. et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: More pieces to the puzzle. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–6, 2012.
- FERREIRA, B. L.; FERREIRA, É. R.; BONFIM-MELO, A.; MORTARA, R. A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes selectively trigger the PI3K/Akt and Erk pathways during HeLa cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 10, p. 485-489, 2019.
- GILMORE, T. D. Introduction to NF-κB: Players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680–6684, 2006.
- GREEN, D.R; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 12, p. a006080, 2015.
- GRIMSEY, N.J.; NARALA, R.; RADA, C.C.; MEHTA, S.; STEPHENS, B.S.; KUFAREVA, J.L.; et al. A Tyrosine Switch on NEDD4-2 E3 Ligase Transmits GPCR Inflammatory Signaling. **Cell reports**, v. 24, n. 12, p. 3312–3323, 2018.
- GROOTJANS, J.; KASER, A.; KAUFMAN, R.J. BLUMBERG, R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 8, p. 469–484, 27 ago. 2016.
- HALL, B. S.; TAM, W.; SEN, R.; PEREIRA, M. E.A. Cell-specific activation of nuclear factor-κB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 1, p. 153-160, 2000.
- HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUNTER, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 42–52, 1988.
- HIGUERA, S.L.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J.D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013.
- HOVSEPIAN, E.; PENAS, F.; SIFFO, S.; MIRKIN, G. A.; GOREN, N. B. IL-10 inhibits the NF-κB and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n.11, p. e79445, 2013.
- HUANG, H.; CALDERON, T. M.; BERMAN, J. W.; BRAUNSTEIN, V. L.; WEISS, L. M.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H. B. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-κB and induces vascular adhesion molecule expression. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5434-5440, 1999.

- IHLE, J.N. Cytokine receptor signalling. **Nature**, v. 377, n. 6550, p. 591–594, 1995.
- JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. Antropologia e Saúde collection. SciELO Books, 2000.
- KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 827–837, 2005.
- KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J.C. P38 MAP kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 9, p. 717–726, 2003.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. 1-11, 2009.
- LEMMON, M.A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v.141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.
- LIMA, L.; ESPINOSA-ALVAREZ, O.; ORTIZ, P.A.; TREJO-VARÓN, J.A.; CARRANZA, J.C.; PINTO, M.C.; et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, p. 166-177, 2015.
- MAGDESIAN, M. H.; et al. Infection by *Trypanosoma cruzi*: Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19382–19389, 2001.
- MANNING, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. **Science**, v. 298, n.5600, p. 1912–1934, 2002.
- MANNING, B.D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, p.381-405, 2017.
- MARCILI, A., LIMA, L., CAVAZZANA, M., JUNQUEIRA, A.C., VELUDO, H.H., RAMÍREZ, F., CAMPANER, M., et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009.
- MARTIN, J.; ANAMIKA, K.; SRINIVASAN, N. Classification of protein kinases on the basis of both kinase and non-kinase regions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2010.
- MITCHELL, S.; VARGA, J.; HOFFMAN, A. Signaling via the NFkB system. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 8, p. 227-241, 2016.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 2001.
- MODY, A.; WEINER, J.; RAMANATHAN, S. Modularity of MAP kinases allows deformation of their signalling pathways. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 484–491, 2009.
- MORTARA, R. A. et al. Features of Host Cell Invasion by Different Infective Forms of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 135–137, 1999.
- MOYES, D. L.; RUNGLALL, M.; MURCIANO, C.; SHEN, C.; NAYAR, D.; THAVARAJ, S.; et al. A Biphasic Innate Immune MAPK Response Discriminates between the Yeast and

Hyphal Forms of *Candida albicans* in Epithelial Cells. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 3, p.225-235, 2010.

MUKHERJEE, S. et al. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5274–5282, 2004.

NENNIG, S.E.; SCHANK, J.R. The Role of NFkB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. **Alcohol and Alcoholism**, v. 52, n. 2, p. 172-179, 2017.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a000034, 2009.

OPAS. Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 160, 2009.

OMSa. **Organização Mundial de Saúde**, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>, acesso em: 28/02/2020.

OMSb. **Organização Mundial de Saúde**, 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>, acesso em: 28/02/2020.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS, G.T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 2001.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PETERSEN, C. A.; KRUMHOLZ, K. A.; CARMEN, J.; SINAI, A. P.; BURLEIGH, B. A. *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1580-1587, 2006.

PINTO, A. M.T.; SALES, P. C.M.; CAMARGOS, E. R.S.; SILVA, A. M. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF-κB activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1518-1529, 2011.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100–3112, 2007.

REIS-CUNHA, J.L.; RODRIGUES-LUIZ, G.F.; VALDIVIA, H.O.; BAPTISTA, R.P.; MENDES, T.A.; MORAIS, G.L.M.; et al. Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. **BMC Genomic**, v.16, n.e499, 2015.

REIS-CUNHA, J.L.; VALDIVIA, H.O.; BARTHOLOMEU, D.C. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. **Current Genomics**, v. 19, n.2, p. 87-97, 2018.

RUB, A.; DEY, R.; JADHAV, M.; KAMAT, R.; CHAKKARAMAKKIL, S.; MAJUMDAR, S.; et al. Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. **Nature Immunology**, v.10, n.3, p.273–280, 2009.

- SAXTON, R.A.; SABATINI, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.
- SILVA, M. C.; DAVOLI-FERREIRA, M.; MEDINA, T. S.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, G. K.; LOPES, C. D.; et al. Canonical PI3K $\gamma$  signaling in myeloid cells restricts *Trypanosoma cruzi* infection and dampens chagasic myocarditis. **Nature Communications**, v.9, n.1, p.1-14, 2018.
- SOARES-SILVA, M. et al. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: Role in immune evasion by trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.
- SOBRINHO, J.L.S.; FONTES, D.A.F.; LYRA, M.A.M.; SOARES, M.F.L.R.S.; NETO, P.J.R. Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 283–289, 2009.
- SUMAN, S; RACHAKONDA, S.; MANDAPE, S.N.; SAKHARE, S.S.; VILLALTA, F.; PRATAP, S.; et al. Phospho-proteomic analysis of primary human colon epithelial cells during the early *Trypanosoma cruzi* infection phase. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.12, p. e0006792, 2018.
- TERRAZAS, C. A. et al. MIF Synergizes with *Trypanosoma cruzi* Antigens to Promote Efficient Dendritic Cell Maturation and IL-12 Production via p38 MAPK. **Nature**, v. 178, n. 4546, p. 1332, 2011.
- TURJANSKI, A. G.; VAQUÉ, J. P.; GUTKIND, J. S. MAP kinases and the control of nuclear events. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3240–3253, 2007.
- URBINA, J.A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 2015.
- VANHAESEBROECK, B.; GUILLERMET-GUIBERT, J.; GRAUPERA, M.; BILANGES, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 329-341, 2010.
- WANG, Z.; COLE, P.A. Catalytic Mechanisms and Regulation of Protein Kinases. **Methods in Enzymology**, v. 548, p. 1-21, 2015.
- WILKOWSKY, S. E.; BARBIERI, M. A.; STAHL, P.; ISOLA, E. L.D. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 2, p. 211-218, 2001.
- ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; et al. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.
- ZINGALES, B.; MILES, M.A.; MORAES, C.B.; LUQUETTI, A.; GUHL, F.; SCHIJMAN, A.G.; RIBEIRO, I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828–33, 2014.

## MORFOFUNCIONAL E DOENÇA DE CHAGAS: REVISÃO DE LITERATURA

**Pablo Henrique Cordeiro Lessa<sup>1</sup>, Ingrid Grace Rodrigues Barros<sup>1</sup>, João Gabriel Barbosa Miranda<sup>1</sup>, Kettle Figueiredo Gonçalves<sup>1</sup>, Naara Cota de Almeida<sup>1</sup>, Rosiana Feitosa Vieira<sup>1</sup>, Amanda Alves Fecury<sup>1</sup>, Cláudio Alberto Gellis de Mattos Dias<sup>2</sup>, Ana Rízzia Cunha Cordeiro Forte<sup>3</sup>**

1. Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde (DCBS), Faculdade de Medicina, Macapá, Amapá, Brasil;
2. Instituto Federal do Amapá (IFAP). Docente do Programa de Pós-Graduação ProfEPT em Educação Profissional e Técnica, membro Colegiado do curso de Química;
3. Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, Ceará, Brasil.

### RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é endêmica da América Latina e se desenvolve em três estágios: agudo, indeterminado e crônico. Nos últimos anos, muito se discutiu a seu respeito em razão das intensas migrações internacionais, que aumentaram sua prevalência em áreas não endêmicas, e cuja observância no Brasil permanece em alerta, sendo doença de notificação compulsória. Percebe-se, assim, como crucial compreender e descrever as principais características dessa patologia, bem como conhecer suas medidas de prevenção. Para tal, realizou-se pesquisa envolvendo revisão bibliográfica produzida entre 1993 e 2019 nas bases de dados *Google Scholar*, *Scielo* e *EBSCO Host* utilizando os descritores “doença de Chagas”. A partir dos dados coletados, pode-se visualizar que, entre 1980 e 2014, foram registradas, em razão desta enfermidade, 178.823 mortes no Brasil, cuja transmissão se dá pela picada acompanhada de fezes do vetor triatomíneo, por transfusão sanguínea e, em menor escala, pela ingestão de alimentos e bebidas infectadas. A forma infectante para o ser humano é a tripomastigota metacíclica. Além disso, as principais alterações anatomopatológicas ocasionadas se relacionam a modificações no coração, esôfago e cólon. Dentre as medidas profiláticas, podem-se citar a aplicação de inseticidas e a higienização de alimentos. A partir dessa compreensão, observa-se a relevância da associação entre a organização microbiológica do parasita e a sua dinâmica com o ambiente e com as políticas de saúde pública, de forma a alcançar uma análise melhor acerca da enfermidade e, assim, preveni-la de maneira mais eficaz.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* e Vigilância epidemiológica.

## ABSTRACT

Chagas' disease, caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is endemic to Latin America and develops in three stages: acute, indeterminate and chronic. In recent years, there was a lot of discussion was taken because of intense international migrations, that increased its prevalence in non-endemic areas. Its observance in Brazil remains on alert, being a disease of compulsory notification. It is clear, therefore, how crucial it is to understand and describe the main resources of this pathology, as well as to know its preventive measures. To this end, it was carried out a research involving bibliographic review applied between 1993 and 2019 in scientific platforms, such as the *Google Scholar*, *Scielo* and *EBSCO Host* using descriptors "Chagas disease". From the data collected, it can be noted that, between 1980 and 2014, 178,823 deaths were recorded in Brazil, where its transmission occurs through the bite accompanied by actions of the triatomine vector, by blood transfusion and, in smaller scale, by eating infected food and beverage. The infectious form for humans is a metacyclic trypomastigote. In addition, the main anatomopathological changes caused are related to changes in heart, esophagus and colon. Among the prophylactic measures, it is mentioned applications of insecticides and food hygiene. From this understanding, the association relevance between the parasitic microbiological organization and its relations to environment and public health policies is observed, in order to obtain a better analysis of the disease and, thus, prevent it in a most effective way.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi* and Epidemiological surveillance.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença endêmica da América Latina que está em expansão em áreas não endêmicas ao redor do mundo devido à migração das Américas Central e do Sul, em que os profissionais de saúde devem estar atentos e considerá-la como uma forte hipótese diagnóstica em imigrantes da América com cardiomiopatia idiopática. Ela é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e se desenvolve em três estágios. O primeiro estágio da doença, agudo, é normalmente assintomático, mas em que pode ser percebida febre e calafrios. O segundo, indeterminado, é marcado por parasitemia persistente sem envolvimento do órgão. Por fim, o terceiro, crônico, ocorrido após 10-30 anos da infecção, é marcado por envolvimento cardíaco ou digestivo (RAMALHO et al., 2017).

O agente etiológico da doença tem sua população dividida em seis unidades de tipo discreto (DTU) diferentes, associadas a diferentes formas clínicas. Assim, a partir da subpopulação, as consequências clínicas, anatômicas e fisiológicas podem ser diferentes, abrindo um vasto leque de complicações possíveis (MAGALHÃES et al., 2017).

Uma outra classificação a põe como infecção crônica e sistêmica causada pelo protozoário *T. cruzi*, descoberta em 1909 e que afeta 8 milhões na América Latina,

evoluindo para cardiomiopatia, mega síndromes digestivas ou ambas em 30-40% dos casos. A evolução com agravos patológicos é recorrente, pois é baixa a detecção precoce e o tratamento de indivíduos assintomáticos. Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a doença de Chagas como uma das treze doenças tropicais mais negligenciadas. O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve um ser vivo com imensa diversidade genética que, aparentemente, não é capaz de afetar o inseto infectado. Enquanto isso, nos mamíferos hospedeiros, ocorre o aparecimento de tripomastigotas não replicativos na corrente sanguínea e amastigotas intracelulares replicativos. É neles, também, que, na fase aguda, praticamente todas as células nucleadas podem ser alvo desse agente, até que o sistema imune aja, encerrando-a, mas não eliminando completamente a infecção de alguns tecidos como músculos e gânglios entéricos (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A doença de Chagas também pode ser dividida em fase inicial, que dura de 4 a 8 semanas e fase crônica, que persiste ao longo da vida do hospedeiro. A fase aguda é normalmente assintomática ou acompanhada de síndromes febris autolimitadas, surgidas de 1 a 2 semanas após o contato com o inseto transmissor ou após alguns meses no caso de transfusão sanguínea, e normalmente se encerra espontaneamente em 90% dos casos, mesmo aqueles não tratados. Mortes nessa fase são baixas (5-10%) e ocorrem por miocardite ou meningoencefalite. A fase crônica é composta de fase indeterminada e determinada. A fase crônica indeterminada está presente em 60-70% dos pacientes e é marcada pela presença de anticorpos contra o protozoário causador, eletrocardiograma normal e exames radiológicos do peito, esôfago e cólon normais. Diferentemente, a fase crônica determinada acomete 30-40% dos pacientes e é determinada pelo surgimento de distúrbios cardíacos, digestivo, ou ambos (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Uma das primeiras formas de tratamento referidas como eficazes, nos casos de doença avançada, foi o transplante cardíaco, que logo suscitou a possibilidade de reinfecção. A reocorrência de Chagas, assim, foi uma grande preocupação para o transplante de coração e que, durante muito tempo, foi uma contraindicação, mas que após 1996, por meio do trabalho de Bocchii *et al.*, mudou de categoria, e se tornaram evidentes os benefícios do transplante cardíaco para a cardiopatia de Chagas. Entre eles, estão a taxa de sobrevivência após o primeiro mês do transplante de 83%, desacompanhada de rejeição (53%) e infecção (57%). Outro dado positivo apresentado está na equivalência de rejeição entre transplantados por doença de Chagas ou não, indicando que não há nenhuma evidência que associe um aumento desse indicador associado ao parasita.

Infecções oportunistas parecem ocorrer menos quando os transplantes são decorrentes de doença de Chagas, enquanto a incidência de neoplasias é similar (RAMALHO et al., 2017).

Como se percebe, a sobrevivência de transplantados devido à doença de Chagas é muito alta, sendo de 83% em um ano, 76% em dois anos, 62% em seis anos e 46% em dez anos, justificando o transplante cardíaco como importante método de tratamento (BESTETTI; THEODOROPOULOS, 2009).

A doença de Chagas é transmitida para a espécie humana e para mais de 150 espécies de animais domésticos e mamíferos selvagens principalmente por insetos sanguessugas da subfamília *Triatominae*, composta por mais de 130 espécies, mas das quais apenas algumas são capazes de transmiti-la. As três principais espécies transmissoras ao homem são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, responsáveis principalmente, pelas transmissões na região subamazônica (sul da América do Sul), no norte das Américas do Sul e Central e no norte do México, respectivamente. Eles podem transmitir nos estágios de ninfa e adulto por ambos os sexos, sendo a maior incidência de infecção naqueles indivíduos mais velhos e que se alimentam mais vezes (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

No entanto, não só os insetos transmitem-na, mas também outras formas, como transfusões sanguíneas, transmissão vertical da mãe para o filho e por doação de órgãos infectados. Entretanto, mesmo se houver transfusão de indivíduo infectado, o risco de contaminação é baixo, de apenas 10-20%, e ocorre principalmente devido às plaquetas. Essas são as principais formas de transmissão em áreas urbanas e países não endêmicos (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Referente ao Brasil, muito se publicizou a respeito da possibilidade de infecção pela ingestão de alimentos e bebidas contaminados. Nesse sentido, muito tem se divulgado a respeito do risco da ingestão de açaí e de caldo de cana contaminada com seu o agente causador. No entanto, ela é raramente contraída pela ingestão de comida ou líquidos contaminados. Por outro lado, caso seja transmitida dessa forma, normalmente há uma infestação massiva que resulta em manifestações agudas e alta mortalidade (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

A doença de Chagas, assim nomeada em homenagem ao seu descobridor Carlos Chagas, é provocada por um protozoário flagelado da família *Trypanosomatidae*, o *T. cruzi*, que é transmitido através da picada e fezes do vetor triatomíneo. O ciclo do *T. cruzi* apresenta quatro estados evolutivos, e, em todos eles, a posição do seu cinetoplasto (organela que ajuda a suprir a alta demanda energética de estruturas móveis como flagelos) com relação ao núcleo e a bolsa flagelar podem ser usados como táticas de diferenciação morfológica. A forma infectante para o ser humano é a tripomastigota metacíclico - o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão posteriores ao núcleo e ao flagelo. Ao infectar células teciduais, a forma tripomastigota sofre uma alteração e se torna amastigota, caracterizada pelo formato arredondado e flagelos não proeminentes. No tubo digestório dos triatomíneos, ocorre a forma epimastigota, definida pela posição anterior ao núcleo do seu cinetoplasto e da sua bolsa flagelar (PEREIRA, 2016).

O ciclo da doença é bem específico e vicioso. Começando pela picada de triatomíneos, seguida de defecação do inseto, com a consequente coceira pela pessoa que empurra as fezes em direção à perfuração feita pela probóscide do animal, permitindo com que a forma infectante de humanos do *T. cruzi*, o tripomastigota metacíclico, penetre na corrente sanguínea do hospedeiro em busca de células teciduais. Ao penetrar uma célula, o agente etiológico se diferencia em amastigota, começa a se replicar por divisão binária e se diferencia em tripomastigota sanguíneo, que rompe a célula e é liberado na corrente sanguínea pronto para outro ciclo, podendo infectar outras células. É importante frisar que apenas as formas tripomastigotas podem ser encontradas na corrente sanguínea (FURTADO, 2015).

No caso dos triatomíneos (vetor de transmissão), a forma infectante é o tripomastigota sanguíneo. Ao sugarem sangue de um hospedeiro, os insetos absorvem esta forma evolutiva que irá se diferenciar em epimastigota no intestino do animal. A partir de então, passam a se multiplicar e se diferenciam em tripomastigotas, passando por um processo de metaciclogênese na porção final do intestino (ampola retal). Após essa etapa, surgem os tripomastigotas metacíclicos, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e darem continuidade ao ciclo do *T. cruzi* (FURTADO, 2015). Importa ressaltar que pesquisas

genéticas da década de 1980 demonstram que o *T. cruzi* é um organismo diploide e que a reprodução sexuada é inexistente, o que justifica sua estrutura populacional meramente clonal.

Além disso, as análises de RNA-ribossômico e de genes de mini-exon mostram a existência de duas linhagens de *T. cruzi*, nomeadas pelos laboratórios de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Essa informação traz uma nova visão epidemiológica, já que o a linhagem I apresenta uma adaptação preferencial a gambás, enquanto a linhagem II, a símios. Isso explica a predominância do tipo I no ciclo silvestre e do tipo II no ciclo urbano (ZINGALES, 2011).

Além da via vetorial clássica, a doença de Chagas também possui outras formas de transmissão, que são: a transfusional, a congênita, pela via oral (alimentos contaminados), por acidentes laboratoriais, pelo manejo de animais infectados, por transplantes de órgãos sólidos e por meio do leite materno. Entre elas, a transfusional é o segundo principal meio de transmissão nos meios urbanos e em países não endêmicos, o que ocorre devido ao crescente número de pessoas infectadas e a negligência na fiscalização dos doadores (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2015).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Em 1908, o médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas identificou um parasita silvestre que denominou de *T. cruzi* e, em 1909, descreveu o primeiro caso de infecção humana. A enfermidade foi denominada mais tarde como doença de Chagas, tendo em vista a descoberta de todo o ciclo causador (agente etiológico, vetor e hospedeiro) (CHAGAS FILHO, 1993).

No entanto, após a descoberta, apenas 14 trabalhos foram publicados sobre a doença, sendo 12 do próprio pesquisador Carlos Chagas. Esse fato acarretou na descrença de alguns médicos e pesquisadores sobre a real confirmação desta enfermidade, influenciando, assim, as poucas notificações e novas descobertas durante as décadas iniciais do século XX, sucumbindo na restrição dos registros de novos casos (PITELLA, 2009).

Em contrapartida, após 1950 a doença passou a ser notificada em decorrência do aumento de casos proporcionado pela industrialização e urbanização oriundas do êxodo rural, o que favoreceu a infestação da doença. Essa problemática foi embasada pela

estimativa de 6,5 milhões de casos de pessoas infectadas por *T. cruzi* entre 1975 e 1980 (DIAS et al., 2015)

Em 2015, a Organização Pan-Americana da Saúde afirmou que 7,7 milhões de indivíduos foram infectados na América Latina. Entre 1997 e 2006, Uruguai, Chile e Brasil conseguiram interromper a transmissão do *T. cruzi* por vetor domiciliar. Atualmente, alguns países endêmicos da América Latina estão analisando a presença do parasita na maioria das doações de sangue, o que diminuiu drasticamente a presença de sangue infectado e contaminação subsequente por esta via. Além disso, a infecção aumentou nos Estados Unidos, parte da Europa e do Pacífico Ocidental na primeira década do século XXI em consequências das migrações de indivíduos infectados para esses países (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Entre os focos ao redor do mundo, a América Latina é detentora dos maiores números de casos da doença. Entretanto, os avanços sobre o controle do vetor proporcionaram a redução significativa da quantidade de pessoas infectadas - de 30 milhões em 1990 para 5,74 milhões em 2010. Nessa perspectiva, observa-se a importância do controle epidemiológico do vetor que está relacionado com os agravos das condições urbanistas migratórias e socioeconômicas do local de manifestação, sendo todos esses fatores preponderantes para o controle da infestação (DIAS et al., 2015).

Entre o período de 1980 a 2014, foram registrados 178.823 casos de morte por doença de Chagas no Brasil. Neste número, destaca-se o percentual de morte prevalente na população do sexo masculino, representando 6,08 óbitos/100.000 homens. As Regiões com maior expressividade foram Centro-Oeste, com 20,02 óbitos/100.000 habitantes, e Sudeste, com 5,66 óbitos/100.000 habitantes. Nesse cenário, a região Norte foi identificada com o menor registro de casos de mortalidade, porém apresentou um acréscimo percentual de 33,3% nas taxas comparando o primeiro e o último registro (0,72 – 0,96 óbitos/100.000 habitantes) (SIMÕES et al., 2018).

No Brasil, entre 2012 e 2016 foram registrados quase 20 mil suspeitas de doenças de Chagas aguda, sendo confirmados pouco mais de mil casos. Nesse contexto, a Região Norte apresenta 97,1% dos casos nacionais. Os estados identificados com maior incidência são o Pará, com 2,9 casos/100 mil habitantes e o Amapá, com 1,5 casos/100 mil habitantes. Desta forma, constata-se a necessidade de políticas de controle epidemiológico para esses territórios (BRASILc, 2019).

Em 2017, foram confirmados 23 casos de doença de Chagas aguda no Sistema de Informação de Agravos de Notificação referentes ao Estado do Amapá. Comparando-se

com anos anteriores, observa-se que a quantidade de confirmações de casos notificados tem diminuído, sendo, respectivamente, de 12 casos em 2014, de 6 casos em 2015 e de 4 casos em 2016. Diante disso, a diminuição dos casos, apesar da possibilidade de realmente estar caindo na região, pode se dar por notificação ineficiente ou por descontinuidade das ações de vigilância epidemiológica no Estado (BRASILc, 2019).

Referente à taxa de mortalidade por doença de Chagas houve significativa redução no estado do Amapá, passando de 0,40 em 2014 para 0,00 em 2016, ambos em consideração a 100 mil habitantes (BRASILd, 2019).

O município de Macapá é o que faz a maior parte das notificações do estado do Amapá. Informou assim, 10 casos de doença de Chagas em 2014, 3 casos em 2015, 4 casos em 2016 e 23 casos em 2017 (BRASILc, 2019).

## 2.3 ANATOMOPATOLOGIA

As principais alterações anatomopatológicas decorrentes da doença de Chagas relacionam-se a modificações no coração, esôfago e cólon. No que diz respeito ao envolvimento cardíaco, o qual é o mais frequente dentre as manifestações observadas, cerca de 30% dos indivíduos infectados desenvolvem distúrbios do ritmo cardíaco. Essas alterações ocorrem, geralmente, anos após a contaminação pelo parasita e as formas mais graves, como fenômenos tromboembólicos, manifestam-se cerca de 10 a 30 anos depois. A miocardite crônica envolve dilatação cardíaca e formação de aneurismas ventriculares, principalmente na região apical, acometendo a circulação sistêmica e pulmonar devido aos trombos produzidos (SCANAVACCA, 2014).

Além disso, os tecidos cardíacos podem sofrer fibrose, o que corrobora ainda a ocorrência de arritmias ventriculares e distúrbios da condução atrioventricular e intraventricular. Entre 55 a 65% dos casos, há morte súbita, mesmo que não haja sintomas cardíacos. Há morte, ainda, em 25 a 30% dos casos de insuficiência cardíaca e em 10% dos de embolia pulmonar. Outros fenômenos comuns são extrassístoles ventriculares em virtude da disfunção e dilatação do ventrículo esquerdo, as quais podem provocar taquicardias ventriculares (SCANAVACCA, 2014).

Em estudo realizado com cães, foram feitas investigações morfológicas concernentes à possibilidade da existência de lesões cumulativas nos corações dos animais. A pesquisa indicou que a longa sobrevivência do parasita no hospedeiro deriva da constante mudança dos focos de inflamação no músculo cardíaco, sugerindo que as

lesões de miocardite são autolimitadas e cíclicas. De forma mais pormenorizada, ocorre o seguinte: o parasita atrai células inflamatórias enfraquecidas, no tocante à questão imune, que se acumulam no tecido intersticial e sofrem fibrose. Após certo tempo, essas células sofrem apoptose, enquanto o excesso de matriz é degradado e reabsorvido. Ou seja, o aparecimento e posterior desaparecimento de lesões no coração demonstra ser equilibrado, autolimitado e cíclico (ANDRADE, 2005)

Ressalta-se, ainda, que as modificações anatômicas no esôfago são fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago nos pacientes que já apresentam megaesôfago resultante da doença de Chagas. O megacólon, por outro lado, apresenta-se como fator protetor à carcinogênese colorretal. A possível explicação para essa análise se fundamenta no fato de que o *T. cruzi* torna a mucosa do cólon menos sensível aos carcinógenos químicos, provocando uma desnervação plexular mioentérica, o que, por sua vez, torna o cólon mais resistente ao surgimento de tumores (GULLO *et al.*, 2012).

O trato gastrointestinal é innervado pelas cadeias extrínsecas, que são supridas pelo sistema nervoso simpático e parassimpático, e intrínsecas, oriundas da parte autônoma do sistema nervoso. Há, na parede do trato, 108 neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores responsáveis pela peristalse, mudanças do fluxo sanguíneo local e secreção de água e eletrólitos (GULLO *et al.*, 2012).

Em condição patológica gerada pelo *T. cruzi*, como mudanças na flora bacteriana, no pH e na parede intestinal, essa rede nervosa pode sofrer degeneração plexular ou desnervação pós-ganglionar parassimpática, provocando hipertrofia muscular e hiperplasia da mucosa, o que propicia o surgimento do megaesôfago e megacólon na fase crônica da doença. Entretanto, a despeito de não haver alterações neuronais ou dilatação nesses órgãos, alterações secundárias podem ocorrer. Nos pacientes com megacólon chagásico, é comum fibrose, hiperplasia da mucosa e inflamação (GULLO *et al.*, 2012).

Estudos distinguem a doença de Chagas em fase aguda e crônica. A primeira, com duração de até 60 dias, é resultante da destruição de células neurais do plexo miontérico do tubo digestivo, o que provoca distúrbios de motilidade e acalasia do esfíncter do esôfago e do ânus. A segunda, por seu turno, apresenta duração indeterminada e ambas são diagnosticadas mediante exames clínico-laboratoriais e radiológicos (FIGUEIRÊDO *et al.*, 2002).

Ademais, observa-se que, à medida que a doença evolui, aumenta-se o diâmetro das vísceras ocas, isto é, coração, cólon, esôfago, duodeno e estômago. Neste último,

relata-se a existência de alterações de forma, tono e motricidade, como hipotonia, hipoperistaltismo, dilatação e esvaziamento retardado. No duodeno, verifica-se hipotonia, diminuição do peristaltismo, trânsito retardado, estase e pregas mucosas mais espessas. Conseqüentemente, o fluxo alimentar ao longo do trato gastrointestinal fica prejudicado. Inclusive, em 90% dos casos o reto também sofre dilatação (FIGUEIRÊDO et al., 2002).

## 2.4 HISTOPATOLOGIA

No que diz respeito à forma cardíaca aguda da doença de Chagas, os sinais histológicos se caracterizam por uma vigorosa reação inflamatória que mobiliza diversas células do sistema imune, como macrófagos, fibroblastos e linfócitos. A partir dessa resposta, são formadas reações granulomatosas, compostas por pequenos nódulos com os tipos celulares da imunidade acumulados com parasitas, com a intenção de isolar esse agente. Contudo, podem surgir pontos inflamados sem que os parasitas estejam presentes, denominados chagomas metastáticos. Além desses, ocorrem angiogênese na região e inflamação no tecido adiposo subcutâneo, formando os nódulos de paniculite. Essas manifestações acontecem da mesma forma no tecido muscular esquelético (HIGUCHI, 2017)

Ainda sobre a tipologia aguda, após as formas amastigotas dos parasitas alcançarem a corrente sanguínea, elas percorrem todo o organismo e invadem órgãos como o coração e o intestino. A sua presença nas células pode ser confirmada pelos cortes histológicos, como nos macrófagos, células endoteliais, fibras musculares lisas, cardíacas e esqueléticas, e fibroblastos. Um acometimento comum e que pode levar a óbito é a miocardite, na qual se pode observar inflamação linfo-histiocitária, em que as fibras musculares, além de afastadas umas das outras por edema, sofrem lise (HIGUCHI, 2017)

Abordando a variante cardíaca crônica é possível encontrar miocardite causada por células mononucleares, o que estimula a formação de tecido fibroso em substituição ao tecido lesionado. Ademais, é incomum a formação de pontos de concentração de parasitas, chamados “ninhos”, e os miócitos se apresentam hipertrofiados. Observa-se que a composição principal do infiltrado resultante da inflamação é de linfócitos e macrófagos, complementados por eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos. Importante ressaltar que não há relação direta entre a quantidade de parasitas e de infiltrado produzido (HIGUCHI; REIS; KAWAKAMI, 2016; HIGUCHI, 2017).

Por fim, no que se trata da doença crônica indeterminada, alguns pontos devem ser abordados. Nesse caso, diferente da forma crônica cardíaca, as fibras musculares não passaram pelo processo de hipertrofia e de lise com tanta frequência, nem pela formação de fibrose e de infiltrado inflamatório. Pode-se ressaltar, também, que a cardiopatia chagásica se caracteriza pelo aumento progressivo do processo inflamatório em que há constante destruição de fibras miocárdicas e a formação de tecido fibroso. Dessa forma, os três tecidos componentes do coração - epicárdio, endocárdio e miocárdio - são comprometidos, provavelmente pela ação de linfócitos T reagentes tanto ao parasita quando aos seus antígenos (THIERS; BARBOSA; PEDROSA, 2013).

## 2.5 FISIOPATOLOGIA

As manifestações clínicas da doença de Chagas na fase aguda normalmente não ocorrem, possivelmente pela baixa carga parasitária. Se ocorrerem, podem se manifestar em febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos, edema subcutâneo e inflamação do local de picada do vetor, arritmia sinusal, bloqueio atrioventricular de primeiro grau, baixa voltagem do complexo QRS, mudanças nas ondas T e variados graus de cardiomegalia. Na transmissão vertical de crianças, elas podem apresentar hipotonia, febre, hepatoesplenomegalia, anemia, prematuridade, baixo peso ao nascer e baixo índice de Apgar. Os danos teciduais durante essa fase ocorrem devido ao próprio parasita e à resposta inflamatória aguda do hospedeiro envolvendo células T auxiliares (T CD4+ e T CD8+), liberando citocinas, como interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 12 (IL-12), auxiliando a produção de óxido nítrico, que tem potente ação tripanocida - contra o agente etiológico (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Já na fase crônica, que não é completamente compreendida, a relação entre a contenção parasitária imunomediada e a inflamação dos tecidos determinam o curso da doença – se a resposta imunológica for ineficiente ou leva a danos teciduais, a carga parasitária e a inflamação crescem, ao passo que se a resposta imune for eficiente, a carga parasitária é diminuída, ocorre menor inflamação e menor dano tecidual. Também há possibilidade de haver autoimunidade capaz de causar dano tecidual. Ocorre também progressiva, de baixa intensidade e incessante miocardite que compromete a função contrátil e a dilatação das quatro câmaras cardíacas, bem como aneurismas apicais no ventrículo esquerdo, sobretudo nos estágios iniciais. Tudo isso promove bloqueio atrioventricular, intraventricular e disfunção sino-nodal, e a progressiva destruição de

células cardíacas faz surgir tecido fibroso que acarreta em insuficiência cardíaca e arritmias ventriculares. Também ocorrem anormalidades na microvasculatura coronariana e hipoperfusão focal que pode levar a danos no miocárdio. Ela também afeta o aparelho gastrointestinal e é causada pela destruição dos gânglios autonômicos intramurais, que afetam o esôfago e o cólon (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Ainda na fase crônica, pode ocorrer ausência de sintomas até doença severa. A parte digestiva é vista quase exclusivamente ao sul da Amazônia – megaesôfago e megacólon em 10-15% dos pacientes crônicos. O megaesôfago causa disfagia com odinofagia, dor epigástrica, ptialismo, desnutrição e pode acarretar em câncer nessa região. Já o megacólon causa obstipação, distensão abdominal e, ocasionalmente, obstrução do intestino grosso, mas não foi encontrada evidência de que aumente a incidência de câncer colorretal (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A forma cardíaca da doença é a mais frequente e séria, que se apresenta em 20-30% e que leva a anormalidades do sistema de condução, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolismo, morte súbita e batimentos ventriculares prematuros. A arritmia parece decorrer da estimulação ventricular por um circuito de reentrada no intramiocárdio ou subepicárdio localizados na lateral inferior-posterior do ventrículo esquerdo. A insuficiência cardíaca é, normalmente, última manifestação, sendo normalmente biventricular com predominância do lado direito por edema periférico, hepatomegalia e ascite, e menos por congestão pulmonar. Embolismo pulmonar também é ocorrência frequente. Morte súbita é a principal causa de óbito de pacientes, responsável por dois terços das mortes, seguido por insuficiência cardíaca refratária (25-30%) e tromboembolismo (10-15%). Ela ocorre, principalmente, em pacientes nos estágios iniciais da doença de Chagas (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A cardiopatia de Chagas (CCM) é uma complicação severa da doença que é indicada ao transplante cardíaco. No entanto, foi reportado o caso de uma paciente com 56 anos que recebeu o coração de um doador e que não foi alvo de rejeição aguda ou da reativação pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi* por meio do uso de terapia imunossupressora incluindo prednisona, tacrolimus e micofenolato mofetil, apresentando, 12 meses após cirurgia, vida normal (RAMALHO et al., 2017).

Após transplantes cardíacos, a reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* deve ser monitorada por uma série de sinais, sintomas e exames, entre os quais estão sintomas de envolvimento cutâneo, cardíaco e neurológico, eletrocardiograma, ecocardiograma,

Proteína C reativa (PCR) e biópsia endomiocárdica, sem a necessidade de terapia profilática (RAMALHO et al., 2017).

Entre as complicações em pacientes não transplantados, a cardiopatia resulta progressivamente e lentamente da miocardite crônica associada a hipoperfusão focal por anormalidades na microvasculatura das coronárias, causando dilatação das quatro regiões do coração, formação de apicalaneurismas típicos e dano ao tecido conjuntivo. Esse fenômeno é responsável pela maior frequência de disfunção sistólica crônica em países endêmicos, e dois terços dos pacientes acometidos morrem por morte cardíaca súbita, tromboembolismo e insuficiência cardíaca (RAMALHO et al., 2017).

Quando atinge essa etapa, podem resultar efeitos patológicos severos, indicando a necessidade de transplante cardíaco. Entre eles, ocorre redução da fração de ejeção ventricular para valores abaixo de 20%, comprometendo consideravelmente a circulação periférica, além de alterar o pico de consumo de oxigênio normal para valores acima de 10 mL/kg/min (referência de 3,5mL/kg/min), e alterar o índice cardíaco para 1,15 L/min/m<sup>2</sup> (referência de 2,8-4,2 L/min/m<sup>2</sup>). Pode também levar à hiponatremia, com redução da concentração sérica de sódio para valores próximos a 130mEq/L (referência de 135-145 mEq/L) e ao aumento da liberação do peptídeo natriurético cerebral para valores acima de 1000 pg/mL (referência de 30-36 pg/mL) (RAMALHO et al., 2017).

O parasita *T. cruzi* também induz ativação e apoptose de neutrófilos humanos. Essas células representam mais de 50% dos leucócitos circulantes, são as primeiras células recrutadas para locais de infecção e contribuem na ligação das imunidades inata e adaptativa, sendo de extrema importância para a defesa do hospedeiro. Além disso, possuem curto tempo de vida e, após sofrer apoptose, são retiradas por macrófagos, que estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias. Neutrófilos são capazes de destruir formas intracelulares do protozoário causador e aumentam a atividade na presença do fator estimulador de colônias. Na fase indeterminada da doença, ocorre baixa produção de citocinas, dificultando, dessa forma, a atuação dessas células (MAGALHÃES et al., 2017).

A terapia antiparasitária com nifurtimox e benznidazol pode ser curativa no estado agudo, mas não é capaz de atingir esse resultado na fase indeterminada. Nesta fase, os medicamentos podem impedir a progressão para formas agressivas crônicas e a transmissão congênita. Na fase crônica, podem reduzir a detecção do parasita, mas não possuem impacto na progressão clínica (RAMALHO et al., 2017).

Além disso, o protozoário possivelmente apresenta um mecanismo de escape do sistema imunológico que permite a sobrevivência prolongada, uma vez que, a partir dos

resultados das pesquisas desenvolvidas, percebeu-se que a viabilidade de neutrófilos foi diminuída, mas não de monócitos. Embora sejam ativados por esse agente, a apoptose nos neutrófilos também é induzida, desfavorecendo a sua atuação imunogênica, provavelmente pelas altas doses de TNF-  $\alpha$ . O agente também é capaz de se replicar em macrófagos, mas não em neutrófilos, o que é confirmado pela alta intensidade de infecção naquelas células. Diferentes infecções possuem influência sobre os neutrófilos – algumas, como por *Leishmania major*, tende a inibir a apoptose dessas células, ao passo que outras, como por *Trypanosoma cruzi*, tende a promover a apoptose; e o contato de macrófagos com neutrófilos em apoptose favorece o crescimento parasitário e aumenta a parasitemia – a fagocitose destas células favorece a contaminação e reprodução dos microrganismos naquelas (MAGALHÃES et al., 2017).

## 2.6 PROMOÇÃO E PREVENÇÃO À SAÚDE

A iniciativa tomada pela Fiocruz e pela Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi em inglês) tem como objetivo realizar ações de capacitação de agentes de endemias e agentes comunitários de saúde no intuito de promover ações educativas à população. Nesse contexto, essa parceria amplia o acesso a diagnósticos e ao tratamento da doença de Chagas. Dessa forma, pretende reduzir as barreiras produzidas pela falta de capacitação dos profissionais de saúde do Sistema Único de Saúde e o acesso à saúde pela comunidade (DNDi, 2018).

Dentre algumas medidas profiláticas, podem-se citar a adaptação das moradias em regiões de alto risco, de forma a inibir a manutenção e proliferação dos triatomíneos, a elaboração de uma rotina de aplicação de inseticidas em determinados locais, a execução da triagem serológico nos hemoderivados de doadores de sangue. Quanto ao manejo de alimentos, pode-se usar como referência as cinco chaves da Organização Mundial da Saúde para inocuidade dos alimentos: manter o ambiente de preparação limpo, evitar o contato de alimentos crus e já cozidos, ferver até o ponto de cozimento máximo, principalmente carnes, armazenar os alimentos na temperatura adequada e utilizar materiais de preparo e água adequados (AGUILERA, 2015; BRASILa, 2009).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As fases da doença de Chagas implicam na assunção de sua gravidade. Quanto antes descoberta, melhores as hipóteses diagnósticas e melhor o resultado terapêutico esperado do tratamento. Portanto, não se podem ignorar quaisquer alterações mínimas que são típicas da fase aguda, devendo os pacientes procurar o serviço médico assim que perceberem alguma anormalidade, evitando a automedicação.

No Brasil, popularmente se tem o mito de que a principal forma de transmissão da enfermidade se dá por meio do consumo de alimentos e líquidos infectados, ao que foi visto se tratar de forma de contaminação de baixa relevância, tendo em vista a sua pequena probabilidade de ocorrência. Imperioso, destacar, no entanto, a necessidade de manutenção da rigorosa fiscalização sanitária do açaí, dos derivados da cana e de outros produtos que tenham potencial disseminador do agente etiológico.

O transplante de coração, apesar do risco de reaparecimento da doença, ainda urge como uma importante forma de tratamento para aumentar a vida daqueles que são diagnosticados com a doença, diminuindo os níveis de letalidade da patologia e mantendo a qualidade de vida dos pacientes.

Compreender a organização microbiológica do parasita, bem como seus tropismos, mecânica de vetores, relação com o corpo humano, dinâmica com as sociedades humanas, com o ambiente e com as políticas de saúde pública são imprescindíveis para se alcançar uma análise melhor acerca da doença. Por meio dessa compreensão, é possível realizar ações mais eficientes e organizadas oriundas da intersectorialidade dos agentes de saúde e dos entes políticos.

### 4. REFERÊNCIAS

AGUILERA, E. L. R. **Elaboração de um plano de ação para a prevenção da doença de Chagas na comunidade Travessão, Município São Francisco (MG)**. 2015. Disponível em: <<https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/4956.pdf>>, acessado em 20/03/2020.

ANDRADE, Z. A forma indeterminada da doença de chagas em tempos de controle do *Triatoma Infestans*. **Revista De Patologia Tropical**, vol. 34, n. 2, p.105-111, 2005.

BESTETTI, R.; THEODOROPOULOS, T.A.D. A systematic review of studies on heart transplantation for patients with end-stage Chagas' heart disease. **Journal of Cardiac Failure**, v.15, n.3, p. 249-255, 2009.

BRASIL. **Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** Série de manuais técnicos. Brasília, 2009a.

BRASIL. **Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016.** Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Brasília, 2019b.

BRASIL. **Doença de Chagas Aguda – casos confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Amapá.** Portal DataSUS – Ministério da Saúde. Brasília, 2019c.

BRASIL. **Taxas de Mortalidade por doença de Chagas, por UF de residência, 2014 a 2016.** Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) – Ministério da Saúde. Brasília, 2019d.

CHAGAS FILHO, C. **Meu pai.** Rio de Janeiro (RJ): Fiocruz, Casa de Oswaldo Cruz, 1993.

DIAS, J. C. P.; RAMOS JUNIOR, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n. 1, pp. 7-86, 2016.

DNDi. **Drugs For Neglected Diseases Initiative.** Plataforma de Pesquisa Clínica em doença de Chagas. Rio de Janeiro (RJ), informativo n. 08, 2018.

FIGUEIRÊDO, S. S.; CARVALHO, T. N.; NÓBREGA, B. B.; RIBEIRO, F. A. S.; TEIXEIRA, K. S. S.; XIMENES, C. A. Caracterização radiográfica das manifestações esofagogastrointestinais da Doença de Chagas. **Revista Radiol Bras**, v. 35, n. 5, p.293–297, 2002.

FURTADO, C. B. **Caracterização molecular de linhagens de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) em triatomíneos do Distrito Federal.** Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade de Brasília (UnB). Portal da Universidade de Brasília (UnB), 2015.

GULLO, C. E.; ESTOFOLETE, C. F.; GIL, C. D.; CHRISTIANO A. B.; NETINHO, J. G. Formas digestivas da doença de Chagas e carcinogênese: um estudo de associação. **Rev Col Bras Cir**, v. 39, n. 2, p.146-150, 2012.

HIGUCHI, M. L. **Aspectos anatomopatológicos nas diferentes formas clínicas da infecção humana.** Portal da Doença de Chagas – Fiocruz, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/patologia/>>, acessado em: 30/03/2020.

HIGUCHI, M. L.; REIS, M. M.; KAWAKAMI, J. T.; Patogênese da doença de Chagas na era atual: microrganismos e micropartículas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 26, n.4, p.234-239, 2016.

MAGALHÃES, L. M. D.; VIANA, A.; JESUS, A. C.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.; GOMES, J. A.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. **Journal Plus One** 12, v. 11, n.1, p.1-17, 2017.

PEREIRA, M. B. **Genotipagem de "*Trypanosoma cruzi*" isolados de pacientes portadores da doença de Chagas.** Tese de Doutorado apresentada à Universidade

Estadual de Campinas (UNICAMP). Portal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2016.

PITELLA, J. G. H. O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.1, p.67-72, 2009.

RAMALHO, A.R.; PRIETO, D.; ANTUNES, P.; FRANCO, F.; ANTUNES, M.J. Heart transplantation for Chagas cardiomyopathy. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v.36, n.11, p.871-875, 2017.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Revista Lancet**, v.375, n.1, p.1388-1402, 2010.

SCANAVACCA, M. Ablação Epicárdica de Taquicardia Ventricular na Cardiopatia Chagásica Crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 6, p. 524-528, 2014.

SIMÕES, T. C.; BORGES, L. F.; ASSIS, A. C. P.; SILVA, M. V.; SANTOS, J. MEIRA, K. Mortalidade por doença de Chagas no Brasil: análise bayesiana do efeito da idade-período e coorte de nascimento. In: **XXI Encontro Nacional de Estudos**, 2018.

TEIXEIRA, R. B.; OLIVEIRA, S. M. C. Perfil de pacientes portadores da Doença de Chagas em Rio Branco, Acre, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.13, n.4, p.262-265, 2015.

THIERS, C. A.; BARBOSA, J. L.; PEDROSA, R. C. **Cardiopatia Chagásica**. Portal da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro [online], 2013. Disponível em: <<https://socerj.org.br/cardiopatia-chagasica/>>, acessado em 14/03/2020.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? **Revista da Biologia**, vol. 6, n. 1, pp. 44-48, 2011.

## CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E O PAPEL DA IL-1 $\beta$ NA PROGRESSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

**Camila Victória Sousa Oliveira<sup>1</sup>, Hilton Antonio Mata Dos Santos<sup>2</sup>, Emiliano Horacio Medei<sup>3,4</sup>, Marcelo Torres Bozza<sup>1</sup>, Cláudia Neto Paiva<sup>1</sup>**

1. Laboratório de Inflamação e Imunidade, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil;
2. Laboratório de Análises Clínicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil;
3. Laboratório de Cardioimunologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil;
4. Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem – CENABIO/UFRJ; Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

### RESUMO

Os mecanismos patogênicos da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ainda não foram completamente elucidados. Sabemos que apesar de iniciado pelo *Trypanosoma cruzi*, o remodelamento cardíaco na fase crônica da doença de Chagas (DC) tem uma evolução que independe da carga parasitária. Além do mais, ainda que o estabelecimento da resposta Th1 participe na eliminação do parasito, a miocardite fibrosante causada pelos mediadores inflamatórios parece favorecer a progressão da CCC. Embora a ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  contribua para o controle da carga parasitária, ainda não se sabe qual sua participação na progressão da CCC. Uma vez que atua como agente pró-arrítmico e que participa no desenvolvimento de doenças cardíacas, é de suma importância compreender melhor o papel da ativação do inflamassoma e da secreção da IL-1 $\beta$  no comprometimento cardíaco na fase crônica da DC.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, IL-1 $\beta$  e coração.

### ABSTRACT

The pathogenic mechanisms of chronic Chagas cardiomyopathy (CCC) have not still fully elucidated. Even though initiated by *Trypanosoma cruzi* infection, the cardiac remodeling in Chagas disease has an evolution that does not depend on the parasite burden. In addition, despite the establishment of the Th1 response participates in the parasite control, fibrosing myocarditis caused by inflammatory mediators favors the CCC progression. Although the inflammasome activation and, consequently, the release of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  contributes to control parasite burden, it still unknow what its contribution in the cardiac

involvement of CCC. Since it acts as a pro-arrhythmic agent and participates in the development of heart disease, it is important to better understand the role of inflammasome and IL-1 $\beta$  in cardiac involvement in CCC.

**Keywords:** Chagas disease, IL-1 $\beta$  and heart.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma doença infecciosa negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Durante a fase aguda da infecção, em que há uma alta parasitemia, o *T. cruzi* induz a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e a imunidade adaptativa do hospedeiro controla a carga parasitária, embora o parasito nunca seja eliminado (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Anos após a infecção, cerca de 30% das pessoas apresentam manifestações clínicas mais graves com comprometimento cardíaco, levando ao desenvolvimento da cardiomiopatia crônica (CCC) (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Apesar de mais de um século da sua descoberta, os mecanismos envolvidos na progressão da CCC ainda não foram completamente elucidados. Sabemos que a CCC é uma doença inflamatória crônica e que, apesar de iniciada pelo parasito, parece ter uma progressão independente da carga parasitária (BONNEY; ENGMANN, 2015). Vale ressaltar que muito embora a atividade tripanocida do benzonidazol seja capaz de reduzir a detecção do parasita em pacientes acometidos pela CCC, a doença cardíaca ainda progride (MORILLO et al., 2015). Visto que o comprometimento cardíaco ocorre anos após a infecção pelo *T. cruzi*, quando o parasitismo tecidual é raro, a participação de citocinas pró-inflamatórias e de agentes oxidantes vem sendo estudada no miocárdio chagásico (TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002; DUTRA et al., 2014; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018). Muitas questões permanecem abertas sobre o que leva a doença cardíaca a se desenvolver as vezes até décadas após a infecção e, dentre as diversas lacunas, o papel da sinalização da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) tem sido investigado na progressão e gravidade da CCC.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a descoberta da DC, diversos pesquisadores vêm buscando investigar o comprometimento cardíaco dos pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e os mecanismos patogênicos envolvidos na progressão da CCC (DIAS; LARANJA; NÓBREGA, 1945; MARIN-NETO et al., 2007).

Devido à sua ampla variabilidade genética, o *T. cruzi* é caracterizado em diversos tipos biológicos denominados de DTUs (do inglês, “discrete typing unit”), sendo divididos em DTU I a VI (ZINGALES et al., 2009). Diferenças no tropismo tissular demonstram que algumas cepas são mais susceptíveis a infectar células do tecido muscular cardíaco (ANDRADE et al., 2011). Uma vez que os cardiomiócitos são infectados, diversas alterações são observadas na estrutura e fisiologia do coração. A presença de infiltrados inflamatórios, constituídos predominantemente por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, é descrita com frequência em biópsias de pacientes acometidos pela doença (CUNHA-NETO; KALIL, 2001). Por sua vez, a miocardite causada pela inflamação contínua do tecido muscular é capaz de danificar as fibras cardíacas (HIGUCHI et al., 1987). Além da indução da resposta hipertrófica, degeneração tecidual e diminuição da população dos cardiomiócitos, ocorre ainda a deposição do tecido conjuntivo pelos fibroblastos levando a formação da fibrose miocárdica (GARZONI et al., 2008). De modo geral, a infecção das células cardíacas pelo *T. cruzi* resulta num processo de remodelamento progressivo do miocárdio, em que a miocardite fibrosante crônica, inicialmente causada pelo parasito, é capaz de comprometer progressivamente em um início a condução do impulso elétrico no coração podendo levar até uma falha total no seu funcionamento. Como abordada na I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica:

A CCC é essencialmente uma miocardiopatia dilatada em que a inflamação crônica, usualmente de baixa intensidade, mas incessante, provoca destruição tissular progressiva e fibrose extensa no coração (ANDRADE et al., 2011).

Com os avanços tecnológicos foi possível compreender melhor a evolução cardíaca da DC. Além do teste sorológico confirmatório, é fundamental determinar a gravidade dos pacientes chagásicos realizando o acompanhamento clínico a partir do eletrocardiograma (ECG) e monitoramento por Holter, assim como por radiografia do tórax e pelo estudo de ecocardiograma (ECO) associados ainda à ressonância magnética, quando possível. Por

apresentar ainda uma sintomatologia clínica de progressão silenciosa e comum a outras doenças cardiovasculares, normalmente o diagnóstico da forma cardíaca crônica acontece tardiamente quando as anormalidades já se encontram bem estabelecidas. Muitas vezes a indicação de tratamento da CCC em paciente chagásico com comprometimento hemodinâmico e insuficiência cardíaca avançada é o transplante cardíaco (ANDRADE et al., 2011). Por isso, é necessário realizar um diagnóstico precoce e acompanhar a progressão da CCC, além da identificação dos mecanismos envolvidos na gravidade e os fatores de risco de morte (RASSI et al., 2006).

O estudo dos sinais clínicos na cardiomiopatia hipertrófica de origem chagásica é muito importante para a avaliação do prognóstico dos pacientes acometidos pela CCC (ROSSI; RAMOS; BESTETTI, 2003). Sabemos que quanto maior a extensão das lesões miocárdicas, severidade da miocardite, fibrose e o aumento da área cardíaca relacionada à cardiomegalia, maior a gravidade da doença (DIAS; LARANJA; NÓBREGA, 1845; HIGUCHI et al., 1987). Assim, diferentes estágios da CCC foram classificados baseados nas alterações observadas no ECG, ECO, raio-x e também na classe funcional da NYHA (do inglês, "*New York Heart Association*") (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A classificação da NYHA, categorizada de I a IV, baseia-se na severidade dos sintomas e na progressão da insuficiência cardíaca a partir de exames físicos que avaliam a capacidade funcional do paciente (RIBEIRO et al., 2012). De modo geral, as manifestações clínicas na CCC variam bastante, podendo ou não estar associadas entre elas, sendo que os principais achados no coração são alterações do ritmo cardíaco, insuficiência cardíaca e tromboembolismo apical (DIAS et al., 2016).

Diversos tipos de arritmias, em diferentes graus de manifestações e intensidade, são evidenciados nos registros eletrocardiográficos de pacientes chagásicos (BRITO; RIBEIRO, 2018). Dentro os muitos distúrbios do ritmo cardíaco relatados, encontram-se alteração da frequência rítmica e má formação e/ou condução do impulso elétrico (ROJAS et al., 2018). As anormalidades mais prevalentes no ECG de pacientes chagásicos crônicos são: (i) alterações do ritmo ao nível do nódulo sinusal; (ii) fibrilação atrial e *flutter*; (iii) taquicardia e extra-sístole ventricular; (iv) bloqueio atrioventricular (bloqueio A-V) de diferentes graus; (v) bloqueio intraventricular do ramo direito e/ou esquerdo; (vi) mudanças na onda P; (vii) prolongamento do intervalo PR e QRS; (viii) baixa voltagem do intervalo QRS e (ix) anormalidades no segmento ST-T. Nesta mesma linha, Salles e colaboradores (2003) mostraram que um aumento da dispersão do intervalo QT poderia ser utilizada como preditor independente de morte súbita em pacientes chagásicos crônicos.

O desempenho contrátil do tecido muscular cardíaco também pode ficar comprometido na infecção crônica por *T. cruzi* (ROMAN-CAMPOS et al., 2009; NOVAES et al., 2013). Os aspectos clínicos observados no ECO demonstram que a mecânica miocárdica é alterada, principalmente nos casos mais graves da doença (RASSI et al., 2014). As observações mais comuns são dilatação das cavidades atriais e ventriculares, adelgaçamento da parede do ventrículo, disfunção diastólica, aumento da dimensão, redução da fração de ejeção, assim como diminuição do volume sistólico do ventrículo esquerdo, comprometendo assim o débito cardíaco (ACQUATELLA, 2007). Por sua vez, há o estabelecimento da disfunção sistólica e o coração chagásico perde, portanto, a capacidade de transportar o sangue de forma eficiente para o restante do corpo.

Além das alterações do ritmo cardíaco e da disfunção ventricular, distúrbios microvasculares, como aneurismas e fenômenos tromboembólicos são observados (BRAGA et al., 1995). Em conjunto, a anatomo-fisiopatologia das alterações pode resultar numa cardiomiopatia dilatada capaz de provocar uma insuficiência cardíaca progressiva na DC e até mesmo levar a morte súbita (BESTETTI; CARDINALLI-NETO, 2008).

A predição dos medidores de risco da insuficiência cardíaca e morte nos auxiliam em compreender por que alguns pacientes chagásicos são mais susceptíveis à progressão da CCC (RIBEIRO et al., 2012). A estratificação de alguns fatores prognósticos como, por exemplo, gênero masculino, classificação funcional III/IV da NYHA em que há insuficiência cardíaca avançada, baixa voltagem do QRS, maior dispersão do intervalo QT e taquicardia ventricular no ECG, disfunção contrátil do ventrículo esquerdo no ECO e cardiomegalia na radiografia de tórax tem sido associado com maior risco à mortalidade (SALLES et al., 2003; RASSI et al., 2006).

A CCC é resultado de um processo progressivo e complexo que ainda hoje muitas questões permanecem em discussão sobre a patogênese. Sabemos que o estabelecimento da CCC ocorre anos após a infecção pelo *T. cruzi*, quando o parasitismo tecidual é raro (CUNHA-NETO et al., 2011). Há evidências de que mesmo depois de tratar os pacientes acometidos pela CCC com benzonidazol de forma bem-sucedida quanto ao seu efeito tripanocida, o desfecho clínico da doença cardíaca ainda progride (MORILLO et al., 2015). Além disso, a presença de infiltrados inflamatórios em exames histopatológicos escassos de ninhos de *T. cruzi* tem sido associada à insuficiência cardíaca (HIGUCHI et al., 1987). Considerando então o papel da resposta inflamatória contínua no miocárdio no comprometimento tecidual, faz-se necessário a identificação de biomarcadores da resposta

imune que possam estar envolvidos no mecanismo patogênico da CCC (KEATING et al., 2015).

Durante a infecção por *T. cruzi*, receptores do tipo *Toll* (do inglês “*Toll-like receptors*” ou TLR) participam do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). A expressão de genes relacionados ao processo inflamatório é modulada, sendo observada mudança no perfil de citocinas secretadas em direção ao estabelecimento da resposta Th1 (CUNHA-NETO et al., 1998). A indução da resposta Th1, mediada pela ativação da via de sinalização de TLRs dependente da proteína adaptadora MyD88 (do inglês “*myeloid differentiation factor 88*”) é essencial para o controle da infecção (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). De modo geral, o aumento da produção de mediadores inflamatórios, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, é observado em pacientes acometidos pela DC (ABEL et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2002; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Os diversos achados correlacionam uma maior secreção dessas citocinas pró-inflamatórias aos estágios mais graves da CCC (RODRIGUES et al., 2012; FERREIRA et al., 2014; DUTRA et al., 2014). Adicionalmente, a secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, mas não a IL-1 $\beta$ , tem sido associada à morbidade da doença (SOUSA et al., 2014). Por outro lado, a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 tem um efeito protetor associado à forma indeterminada da fase crônica da doença e que se correlaciona com uma melhor função sistólica ventricular (SOUSA et al.; 2014). Embora o estabelecimento da resposta Th1 participe da eliminação do parasita, a miocardite crônica causada pelos mediadores inflamatórios parece favorecer a progressão da doença, reforçando o papel da resposta autoimune na patogênese da CCC (GOMES et a., 2003).

Dentre os diversos mediadores inflamatórios estudados, o papel da ativação do inflamassoma e a secreção da IL-1 $\beta$  têm sido investigados no desfecho da infecção por *T. cruzi* (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015). Inflamassomas são complexos multiprotéicos que são constituídos classicamente por um sensor, a exemplo dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) intracelulares, da família dos NLRs [do inglês, “*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing* (NACHT-LRR)], além da proteína adaptadora ASC (do inglês, “*apoptosis-associated speck-caspase recruit domain*”) e da molécula efetora caspase (CASP) (SCHRODER e TSCHOPP, 2010). O agrupamento dessas proteínas e a formação do inflamassoma se iniciam em resposta a estímulos como a ligação de PAMPs aos TLRs durante a infecção ou alterações da homeostasia celular, com a presença de DAMPs, padrões moleculares associados a danos, além de outros

(SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Esses estímulos levam a uma regulação da transcrição gênica de NLRs e subsequentemente à ativação da resposta inflamatória mediada pela clivagem da proforma de caspase-1. Em seguida, inicia-se o processo de morte celular através de formação de poros na membrana, denominada de piroptose, além da secreção de citocinas pró-inflamatória IL-18 e IL-1 $\beta$  (SCHRODER e TSCHOPP, 2010). Assim como nos TLRs, o MyD88 é o principal adaptador da família do receptor de IL-18 (IL-18R) e IL-1 (IL-1R) e sua ativação induz a secreção de diversos mediadores inflamatórios (WEBER, WASILIEW; KRACHT, 2010). Curiosamente, Oliveira e colaboradores (2017) identificaram que a sinalização IL-18R/MyD88, mas não de IL-1R/MyD88, é importante para o estabelecimento da resposta Th1 no controle da infecção por *T. cruzi*.

Estudos vêm buscando investigar a associação entre o comprometimento cardíaco da DC e os diversos polimorfismos genéticos relacionados aos componentes envolvidos na ativação do inflamassoma e secreção da IL-1 $\beta$ . Recentemente, Fu e colaboradores (2017) observaram que um determinado variante do gene para *CASP* é mais frequente em pacientes com comprometimento cardíaco. Diferenças na genotipagem de *NRLP1* e *IL-1B* também foram observadas em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica em comparação àqueles assintomáticos (FLÓREZ et al., 2006; CLIPMAN et al., 2018). Embora esses resultados indiquem que a variação gênica pode ter associação com a gravidade da doença, Clipman e colaboradores (2018) não encontraram diferença em outro variante polimórfico estudado para *CASP*, assim como Cruz-Robles e colaboradores (2009) para *IL-1 $\beta$* . Foi evidenciada ainda a associação de polimorfismos no antagonista do receptor de IL-1 (*IL-1Ra*) (CRUZ-ROBLES et al., 2009). Esses dados sugerem que algumas variações dos genes para *IL-1 $\beta$*  ou daqueles que participam do inflamassoma podem desempenhar um papel relevante na suscetibilidade da CCC.

A expressão diferencial de moléculas relacionadas à ativação do inflamassoma, principalmente aquela mediada por NLRP3, tem sido investigada na infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 2013; DEY et al., 2014). Análise de microarranjo do coração realizado por Silva e colaboradores (2013) demonstrou que a infecção *in vivo* por *T. cruzi* induz o aumento da expressão de genes envolvidos na ativação do inflamassoma, incluindo *NAIP5*, *NAIP2*, *Panx1*, *PYCARD/ASC*, *caspase-1*, *caspase-11*, *IL-18* e *IL-1R*. Os autores identificaram ainda que os genes que participam da via de sinalização de *NLR* estavam regulados positivamente. De forma similar, Dey e colaboradores (2014) também demonstraram indução da expressão de componentes envolvidos na ativação do inflamassoma, assim como a *IL-1 $\beta$* , em macrófagos humanos.

Tem sido bastante descrita a indução da IL-1 $\beta$  na infecção por *T. cruzi* e sua participação no controle da carga parasitária (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015). O *T. cruzi* é capaz de induzir a clivagem da caspase-1, promovendo o aumento da produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos e no miocárdio de animais infectados, evento este dependente da proteína adaptadora ASC e NLRP3 (SILVA et al., 2013). Animais geneticamente deficientes para os genes *ASC*, *caspase-1* ou *IL-1R* apresentaram redução da inflamação no coração nos primeiros dias da infecção. Ainda assim, em tempos mais tardios, os autores observaram níveis elevados do marcador de lesão cardíaca associados com maior parasitismo no tecido, culminando em morte. O aumento da parasitemia em animais *Asc*<sup>-/-</sup> também foi evidenciado por Gonçalves e colaboradores (2013), embora a curva de sobrevivência não tenha sido alterada. Esses autores observaram ainda o aumento na parasitemia em animais *NLRP3* e *CASP*-deficientes, além da participação dessas proteínas na secreção de IL-1 $\beta$  e NO. Foi demonstrado ainda que macrófagos de camundongos *Nlrp3*<sup>-/-</sup> e *Casp*<sup>-/-</sup> são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, enquanto a produção de NO é inibida (GONÇALVES et al., 2013). Adicionalmente, macrófagos infectados por *T. cruzi*, tratados com IL-1 $\beta$ , apresentaram redução do número de parasitos, além do aumento da produção de NO (SILVA et al., 2013). A redução da carga parasitária, acompanhada também do aumento da produção de NO, foi evidenciada em cardiomiócitos após o tratamento com IL-1 $\beta$  (MACHADO et al., 2000; FICHERA et al., 2004). Sabemos que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , podem potencialmente ativar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que, por sua vez, ROS agem como segundo sinal na ativação do inflamassoma e consequentemente na liberação de IL-1 $\beta$  (SCHRODER e TSCHOPP, 2010; DEY et al., 2014).

Embora tenha sido apontada a participação do inflamassoma e a indução da IL-1 $\beta$  no controle da carga parasitária, ainda existem dados controversos. Recentemente, Paroli e colaboradores (2018) demonstraram não haver diferença na parasitemia, nem na curva de sobrevivência nos animais *Nlrp3*<sup>-/-</sup> em comparação aos selvagens, embora o parasitismo no fígado tenha sido aumentado. Embora Dey e colaboradores (2014) tenham observado aumento da carga parasitária por PCR após o tratamento com anticorpo anti-IL1 $\beta$ , macrófagos deficientes para *NLRP3* apresentaram menor carga parasitária, quantificada por PCR, em comparação ao grupo controle. Por outro lado, os autores não observaram diferenças na média de intensidade de fluorescência nem no tamanho e granulosidade dos macrófagos infectados por *T. cruzi* fluorescente quando estes foram tratados com IL-1 $\beta$  ou

incubados com anticorpo anti-IL-1 $\beta$ . Esses dados contrariam os achados anteriores sobre o papel dessa citocina na carga parasitária.

Recentemente, novas evidências do papel do inflamassoma NLRP3 no controle da carga parasitária têm sido apontadas. Matteucci e colaboradores (2019) demonstraram que a fusão do autofagossomo contendo *T. cruzi* ao lisossomo, e consequentemente a formação do autolisossomo, é inibida em macrófagos deficiente para NLRP3. Dessa forma, os autores sugerem que a ativação do inflamassoma NLRP3 é essencial na indução da autofagia em células infectadas por *T. cruzi*, levando assim a eliminação do parasita (MATTEUCCI et al., 2019).

Embora a ativação do inflamassoma e a secreção da IL-1 $\beta$  controle a carga parasitária na fase aguda da DC, atualmente ainda não se sabe como essa citocina contribui na progressão da CCC. Sabemos que o processo inflamatório é um componente importante na patogênese de cardiomiopatias e que a IL-1 $\beta$  está envolvida no estabelecimento de diversas doenças cardíacas (SZEKELY; ARBEL, 2018). É possível ainda que o mecanismo de retroalimentação positiva da indução de IL-1 $\beta$  e do estresse oxidativo contribua no remodelamento cardíaco na fase crônica da DC (MACHADO; TANOWITZ; RIBEIRO, 2013; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018).

O *T. cruzi* é capaz de reduzir a expressão das conexinas 43 (Cx43) em cardiomiócitos (ADESSE et al., 2011). Cx43 são proteínas estruturais responsáveis pelas junções comunicantes do tipo gap entre as células, participando, portanto, na comunicação intercelular. A expressão dessas proteínas é fundamental para a propagação do impulso elétrico e manutenção do processo de sincronização da contração das células do miocárdio. Dados da literatura têm demonstrado o remodelamento da expressão da Cx43 em células cardíacas após injúria tecidual ou ainda na presença da IL-1 $\beta$ . Baum e colaboradores (2012) demonstraram que a IL-1 $\beta$  reduz a interação entre os cardiomiócitos em modelo animal de infarto do miocárdio. A redução da velocidade de condução e do potencial de ação é evidenciada em cardiomiócitos condicionados com meio de cultura de fibroblastos provenientes de coração infartado (VASQUEZ et al., 2010). Por outro lado, o aumento da expressão de Cx43 tem sido evidenciado nos fibroblastos em modelo de infarto do miocárdio (VASQUEZ et al., 2010). Adicionalmente, a IL-1 $\beta$  também é capaz de aumentar a expressão de Cx43 em fibroblastos cardíacos, assim como reduziu a duração da contração dos cardiomiócitos no co-cultivo (MCARTHUR et al., 2020). Dessa maneira, diferentemente dos cardiomiócitos que inibem a expressão da Cx43 quando ocorre comprometimento cardíaco, limitando assim a transmissão de mediadores entre essas

células, os fibroblastos podem regular positivamente essa proteína, mantendo por sua vez o acoplamento elétrico e a comunicação celular no miocárdio. Foi demonstrado que o transplante de cardiomiócitos embrionários expressando Cx43 no miocárdio infartado é capaz de melhorar o acoplamento elétrico do tecido cardíaco (ROELL et al., 2007). Esses autores demonstraram ainda que houve diminuição da ocorrência de taquicardias ventriculares e do bloqueio de condução do sinal, acompanhada do aumento da velocidade do impulso elétrico. Em conjuntos, esses achados demonstram que a Cx43 tem um papel fundamental na manutenção da eletrofisiologia cardíaca (ROELL et al., 2007). Portanto, é possível propor que a secreção da IL-1 $\beta$  participe da regulação negativa dessa proteína em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* e que estas alterações estejam associadas a maior propensão para o surgimento das arritmias características da CCC.

A infecção por *T. cruzi* promove ainda hipertrofia dos cardiomiócitos a partir da indução do aumento da expressão dos genes para cadeia pesada de miosina alfa e beta (MyHC), que codificam proteínas contráteis, e também o aumento do tamanho celular (PETERSEN; BURLEIGH, 2003). A incubação de cardiomiócitos com o sobrenadante proveniente da cultura de células infectadas contendo altos níveis de IL-1 $\beta$  é capaz de reproduzir esse fenômeno. Por outro lado, o bloqueio da sinalização de IL-1 $\beta$  é capaz de inibir a hipertrofia promovida por essa citocina, sugerindo que o efeito na resposta hipertrófica induzida pelo *T. cruzi* seja causado pela citocina (PETERSEN; BURLEIGH, 2003). Em conjunto, esses dados sugerem que a IL-1 $\beta$  induz hipertrofia em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*.

Uma série de estudos tem demonstrado a participação da IL-1 no remodelamento cardíaco. A IL-1 $\beta$  é capaz de induzir a expressão dos genes para  $\beta$ -MHC e ANF, fator natriurético atrial, considerados marcadores de hipertrofia, em cardiomiócitos de ratos neonatos. (THAIK et al., 1995). Harada e colaboradores (1999) também demonstraram o aumento da secreção de ANF de forma dose e tempo-dependente em cardiomiócitos co-cultivados com fibroblastos após a incubação com IL-1 $\beta$ . Os autores observaram ainda aumento do tamanho celular na co-cultura e alterações morfológicas com um padrão de hipertrofia diferenciado (HARADA et al., 1999). Já em experimento *in vivo*, camundongo superexpressando IL-1 $\alpha$  humana induz o aumento da expressão gênica e  $\beta$ -MHC e ANF e essa hipertrofia miocárdica mediada pela citocina contribui para a insuficiência cardíaca (ISODA et al., 2001). Nishikawa e colaboradores (2006) observaram ainda que a superexpressão de IL-1 $\alpha$  humana promove dilatação do ventrículo esquerdo, embora sua função sistólica tenha sido preservada.

Sabemos que o efeito prolongado da resposta hipertrófica pode levar a morte celular por apoptose, deposição de fibrose tecidual e estabelecimento da cardiomiopatia dilatada (BUJAK; FRANGOIANNIS, 2009). Assim como, níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  estão sendo correlacionados à classe funcional III/IV da NYHA e aos quadros mais graves de insuficiência cardíaca, além do elevado risco de morte (PASCUAL-FIGAL, et al., 2019). Honsenpud, Campbell e Mendelson (1989) já tinham demonstrado que a IL-1 $\beta$  tem um efeito inotrópico negativo no coração. A secreção de IL-1 $\beta$  também tem sido associada com uma maior deposição de proteínas da matriz extracelular em modelo de infarto do miocárdio, contribuindo no remodelamento cardíaco (KOMICI et al., 2017). Bujak e colaboradores (2008) demonstraram que após infarto do miocárdio, animais IL-1 $r^{-/-}$  apresentaram redução dos infiltrados inflamatórios, além da expressão de citocinas e quimiocinas acompanhada ainda da atenuação da fibrose miocárdica e do remodelamento. Tassell e colaboradores (2012) demonstraram ainda que a administração do plasma de paciente com insuficiência cardíaca é capaz de provocar disfunção sistólica em animais saudáveis. Esse dado sugere que fatores solúveis gerados no curso da insuficiência cardíaca alteram a função sistólica, embora os fatores não tenham sido identificados. Em outro trabalho do mesmo grupo, os autores demonstraram que a administração da IL-1 $\beta$  causa, por si só, uma redução transitória da capacidade sistólica do coração e da resposta à estimulação adrenérgica, induzindo uma cardiomiopatia reversível (TASSEL et al., 2013). Combes e colaboradores (2002) demonstraram ainda que a exposição crônica de IL-1 $\beta$  reduz de forma reversível a contratibilidade, além da amplitude do transiente de cálcio em cardiomiócitos. A redução na amplitude de contração e no transiente de cálcio, além da quantidade desse íon dentro do retículo sarcoplasmático, foram observadas em miócitos ventriculares desafiados com IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DUNCAN et al., 2010), e parecem resultantes da ação sinérgica dessas citocinas, uma vez que a contratilidade não foi alterada quando os estímulos foram administrados isoladamente. Duncan e colaboradores (2010) demonstraram ainda uma maior frequência da liberação espontânea de cálcio pelo retículo após o tratamento, evento que favorece a incidência de arritmias.

Embora os efeitos deletérios da IL-1 tenham sido bastante reportados na literatura, alguns autores demonstraram que o pré-tratamento com IL-1 tem um papel benéfico contra a injúria na isquemia e reperfusão (HEDAYAT et al., 2010). Acredita-se que o estímulo prévio com a citocina, capaz de induzir a atividade de enzimas anti-oxidantes, participe atenuando o estresse oxidativo em condições adversas subsequentes.

Há evidências de que a IL-1 module a atividade eletrofisiológica do miocárdio, levando a uma maior susceptibilidade a arritmias (MITROKHIN; MLADENOV; KAMKIN, 2015). Alguns dos mecanismos envolvidos na atuação da IL-1 $\beta$  como agente arritmogênico se baseiam no fato de que essa citocina altera a regulação dos canais de cálcio, aumenta o estresse oxidativo e também inibe a produção de energia pelas mitocôndrias (SZEKELY; ARBEL, 2018). Já foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  regula negativamente a expressão de genes para Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), canais de cálcio e canais de cálcio dependente de voltagem (THAIK et al., 1995; COMBES et al., 2002). Assim como foi demonstrado que a superexpressão de IL-1 $\alpha$  inibe a expressão de canais de cálcio dependente de voltagem (ISODA et al., 2001). De modo geral, alterações na expressão dessas moléculas afetam a homeostase de cálcio, comprometendo assim a função contrátil do coração (HEDAYAT et al., 2010).

A ativação do inflamassoma e, conseqüentemente, a indução da IL-1 $\beta$  contribuem no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GARG, 2011). Diversos estudos têm investigado o papel dessa citocina como um possível biomarcador para o acometimento cardíaco (ZHOU et al., 2018). Dados recentes evidenciaram que a ativação do inflamassoma NLRP3, seguida do aumento da produção da IL-1 $\beta$ , induz fibrilação atrial (YAO et al., 2018). Em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio e obesidade, a ativação do inflamassoma é capaz de promover o remodelamento cardíaco (MEZZAROMA et al., 2011; SOKOLOVA et al., 2019), enquanto que sua inibição farmacológica limita o tamanho do infarto após a lesão de isquemia e reperfusão (MARCHETTI et al., 2014). A produção de IL-1 $\beta$ , também, é capaz de diminuir a corrente transitória de saída de K<sup>+</sup> e aumentar os *sparks* de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos, levando ao prolongamento da duração do potencial de ação e do intervalo QT em modelo de diabetes mellitus do tipo 1 (MONNERAT et al., 2016). Monnerat e colaboradores (2016) também observaram que a sinalização de IL-1 $\beta$  promove a fosforilação e oxidação de CAMKII (do inglês “*calmodulindependent protein kinase II*”), sendo capaz de gerar eventos contráteis espontâneos. Tem sido evidenciada em pacientes com artrite reumatóide, psoríase e outras inflamações crônicas uma correlação do prolongamento do intervalo QT, determinado pelo atraso da repolarização de cardiomiócitos, com o nível de citocinas pró-inflamatórias associadas ao estresse oxidativo, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e do TNF (ADLAN et al., 2015; SORDILLO; SORDILLO; HELSON, 2015).

Em conjunto, as diversas ações da IL-1 $\beta$  sobre o remodelamento miocárdico determinando arritmias e disfunção sistólica candidatam essa citocina a explicar uma série

de cardiomiopatias em que fenômenos como o aumento do intervalo QT, a bradicardia e a disfunção sistólica estão presentes, como no caso da CCC (BOCCHI et al., 2017).

Abordagens terapêuticas tendo como alvo o bloqueio da IL-1 $\beta$  ou a inibição do eixo NLRP3/IL-1 $\beta$  vêm sendo estudadas na patologia das doenças cardíacas (BUCKLEY; ABBATE, 2018). Arritmias induzidas em modelo de diabetes mellitus apresentaram uma melhora após o tratamento com anakinra, um antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), ou ainda pelo inibidor do inflamassoma NLRP3, MCC-950 (MONNERAT, et al., 2016). Tassell e colaboradores (2012) demonstraram que a IL-1 $\beta$  promove a disfunção sistólica em animais saudáveis e que esse comprometimento pode ser revertido após o tratamento com anakinra. O aumento no consumo de oxigênio bem como a duração do exercício foram observados em pacientes com insuficiência cardíaca submetidos ao tratamento com esse antagonista por duas semanas (TASSELL et al., 2012). Os autores ainda demonstraram que o bloqueio de IL-1R em um período prolongado de doze semanas é capaz de aumentar a taxa de consumo de oxigênio e reduz a expressão da proteína c reativa, um marcador de lesão cardíaca (TASSELL et al., 2017). Além do mais, a incidência de morte ou a readmissão hospitalar dos pacientes com o acometimento cardíaco foi menor em comparação ao grupo que receberam placebo (TASSELL et al., 2017). No modelo de isquemia e reperfusão, o tratamento com IL-1Ra diminuiu a expressão de proteínas pró-apoptóticas, assim como o tamanho do infarto do miocárdio, enquanto teve efeito benéfico na função sistólica e diastólica do coração (QIAN et al., 2018). De modo geral, esses achados indicam que o bloqueio de IL-1 $\beta$  apresenta efeito benéfico na progressão de doenças cardiovasculares.

Até o presente momento, estudos ainda não foram realizados no intuito de avaliar o papel da IL-1Ra, como a anakinra, na fase crônica da DC. Muito embora o aumento da liberação de IL-1 $\beta$  seja um mecanismo de eliminação do *T. cruzi*, o bloqueio da sinalização dessa citocina em tempos mais tardios poderá presumivelmente promover melhorias na função cardíaca em pacientes acometidos pela CCC. Acreditamos que essa investigação é necessária para compreender melhor a participação da IL-1 $\beta$  na patogenicidade da CCC.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, o papel da ativação do inflamassoma NLRP3 e, conseqüentemente, da liberação da IL-1 $\beta$  tem sido investigado na interação célula

hospedeira-*T. cruzi*. De modo geral, os estudos sobre a contribuição da IL-1 $\beta$  no desfecho da infecção investigaram principalmente a ativação dos linfócitos T, produção de ROS e a distribuição da carga parasitária na fase aguda da DC. É possível que a indução da formação do autofagossomo mediada pelo eixo NLRP3/IL- $\beta$  evidenciada recentemente, promovendo assim a autofagia do parasito, possa explicar o mecanismo de eliminação do *T. cruzi* observado por diversos autores na presença dessa citocina.

Sabemos ainda que a IL-1 é um importante mediador pró-inflamatório capaz de induzir arritmias e de provocar a disfunção ventricular, contribuindo para a insuficiência cardíaca. Embora muitos estudos tenham mostrado de maneira consistente que IL-1 $\beta$  tem um efeito claro sobre a função elétrica e mecânica cardíaca, ainda novos estudos visando entender a participação causal do eixo NLRP3/ASC/CASP/IL-1 $\beta$  na fisiopatologia da cardiomiopatia chagásica crônica precisam ser conduzidos.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABEL, L.C.J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.
- ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-1131, 2007.
- ADESSE, D. et al. Gap Junctions and Chagas disease. In: WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. (Org.). **Adv Parasitol**, Chagas Disease: Part B. Amsterdam: Academic Press, 2011, v. 76, p. 63-81.
- ANDRADE, J.P. et al. I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. **Arq Bras Cardiol**, v. 97, n. 2, p. 01-48, 2011.
- ADLAN, A.M. et al. Association between corrected QT interval and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 42, n. 3, p. 421-428, 2015.
- BAUM, J.R. et al. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 3, p. H790-H800, 2012.
- BESTETTI, R.B.; CARDINALLI-NETO, A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. **Int J Cardiol**, v. 131, n. 1, p. 9-17, 2008.
- BOCCHI, E. A. et al. Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. **J Am Coll Cardiol**, v. 70, n. 12, p. 1510-1524, 2017.
- BONNEY, K.M.; ENGMAN, D.M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **Am J Pathol**, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.

- BRAGA, J.C. et al. Thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. **São Paulo Med J**, v. 113, n. 2, p. 862-866, 1995.
- BRITO, B.O.F.; RIBEIRO, A.L.P. Electrocardiogram in Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 5, p. 570-577, 2018.
- BUCKLEY, L.F.; ABBATE, A. Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. **Eur Heart J**, v. 39, n. 22, p. 2063-2069, 2018.
- BUJAK, M. et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. **Am J Pathol**, v. 173, n. 1, p. 57-67, 2008.
- BUJAK, M.; FRANGOIANNIS, N.G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. **Arch Immunol Ther Exp**, v. 57, n. 3, p. 165-176, 2009.
- CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem produzida por um *trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*). Nota prévia. **Brasil Med**, v. 230, p. 161, 1909.
- CLIPMAN, S.J. et al. Genetic association study of NLRP1, CARD, and CASP1 inflammasome genes with chronic Chagas cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi* seropositive patients in Bolivia. **PloS one**, v. 13, n. 2, 2018.
- COMBES, A. et al. Chronic exposure to interleukin 1 $\beta$  induces a delayed and reversible alteration in excitation–contraction coupling of cultured cardiomyocytes. **Pflügers Arch**, v. 445, n. 2, p. 246-256, 2002.
- CRUZ-ROBLES, D. et al. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. **Immunol Invest**, v. 38, n. 3-4, p. 231-239, 2009..
- CUNHA-NETO, E. et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.
- CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 187-192, 2001.
- CUNHA-NETO, E. et al. **Autoimmunity**. In: WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. (Org.). Adv. Parasitol.. Chagas Disease: Part B. Amsterdam: Academic Press, 2011, v. 76, p. 129-152.
- DEY, N. et al. Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1 $\beta$ –ROS–NF- $\kappa$ B pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3–/– macrophages. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.
- DIAS, E.; LARANJA, F.S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 43, n. 3, p. 495-582, 1945.
- DIAS, J.C.P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.
- DUNCAN, D.J et al. TNF-alpha and IL-1beta increase Ca<sup>2+</sup> leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. **Cell Calciu**, v.47, n.4, p.378–386, 2010.

DUTRA, W.O.; ROCHA, M.O.C.; TEIXEIRA, M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.

DUTRA, W.O.; et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.

FERREIRA, L.R.P. et al. Interferon- $\gamma$  and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World J Cardiol**, v. 6, n. 8, p. 782, 2014.

FICHERA, L. E. et al. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 359-363, 2004

FLÓREZ, O. et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian case-control study. **Hum Immunol**, v. 67, n. 9, p. 741-748, 2006.

FU, K.Y.J. et al. Association of caspase-1 polymorphisms with Chagas cardiomyopathy among individuals in Santa Cruz, Bolivia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 4, p. 516-523, 2017.

GARG, N.J. Inflammasomes in cardiovascular diseases. **Am J Cardiovasc Dis**, v. 1, n. 3, p. 244, 2011.

GARZONI, L.R. et al. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. **J Infect Dis**, v. 197, n. 6, p. 906-915, 2008.

GOMES, J.A.S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GONÇALVES, V.M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

HIGUCHI, M.L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin Cardiol**, v. 10, n. 11, p. 665-670, 1987.

HEDAYAT, M. et al. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. **Heart Fail Rev**, v. 15, n. 6, p. 543-562, 2010.

HOSENPUD, J.D.; CAMPBELL, S.M.; MENDELSON, D.J. Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. **J Heart Transpl**, v. 8, n. 6, p. 460-464, 1989.

ISODA, K. et al. Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin 1 $\alpha$ . **J Card Fail**, v. 7, n. 4, p. 355-364, 2001.

KEATING, S.M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **Int J Cardiol**, v. 199, p. 451-459, 2015.

KOMICI, K. et al. Cardiac fibrosis in heart failure. *J. Gerontol Geriatr*, v. 65, p. 177-183, 2017.

MACHADO, F.S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MACHADO, F.S.; TANOWITZ, H.B.; RIBEIRO, A.L. Pathogenesis of Chagas Cardiomyopathy: Role of Inflammation and Oxidative Stress. *J Am Heart Assoc*, v.2, n.5, p.e000539, 2013.

MARCHETTI, Carlo et al. A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury following ischemia-reperfusion in the mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 63, n. 4, p. 316, 2014.

MARIN-NETO, J.A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MATTEUCCI, K.C. et al. Frontline Science: Autophagy is a cell autonomous effector mechanism mediated by NLRP3 to control *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol*, v. 106, n. 3, p. 531-540, 2019.

MCARTHUR, L. et al. Regulation of connexin 43 by interleukin 1 $\beta$  in adult rat cardiac fibroblasts and effects in an adult rat cardiac myocyte: fibroblast co-culture model. *Heliyon*, v. 6, n. 1, p. e03031, 2020.

MEZZAROMA, E. et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci*, v. 108, n. 49, p. 19725-19730, 2011.

MITROKHIN, V.M.; MLADENOV, M.I.; KAMKIN, A.G. IL-1 provokes electrical abnormalities in rat atrial myocardium. *Nt. Immunopharmacol*, v. 28, n. 1, p. 780-784, 2015.

MONNERAT, G. et al. Macrophage-dependent IL-1 $\beta$  production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nat Commun*, v. 7, p. 13344, 2016.

MORILLO, C.A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

NISHIKAWA, K. et al. Left ventricular hypertrophy in mice with a cardiac-specific overexpression of interleukin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 291, n. 1, p. H176-H183, 2006

NOVAES, R.D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. *Cardiovasc Pathol*, v. 22, n. 4, p. 270-279, 2013.

OLIVEIRA, A.C. et al. Crucial role for T cell-intrinsic IL-18R-MyD88 signaling in cognate immune response to intracellular parasite infection. *Elife*, v. 6, p. e30883, 2017.

PAIVA, C.N.; MEDEI, E.; BOZZA, M.T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: fuel to infection, poison to the heart. **PLoS pathog**, v. 14, n. 4, 2018.

PAROLI, A.F. et al. NLRP3 inflammasome and caspase-1/11 pathway orchestrate different outcomes in the host protection against *Trypanosoma cruzi* acute infection. **Front Immunol**, v. 9, p. 913, 2018.

PASCUAL-FIGAL, D. A. et al. The interleukin-1 axis and risk of death in patients with acutely decompensated heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 73, n. 9, p. 1016-1025, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PETERSEN, C.A.; BURLEIGH, B.A. Role for interleukin-1 $\beta$  in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect and Immune**, v. 71, n. 8, p. 4441-4447, 2003.

QIAN, W. et al. Mechanism of interleukin-1 receptor antagonist protection against myocardial ischaemia/reperfusion-induced injury. **Arch Cardiovasc Dis**, v. 111, n. 10, p. 545-554, 2018.

RASSI JR, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**, v. 355, n. 8, p. 799-808, 2006.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, D.C. et al. Echocardiographic parameters and survival in Chagas heart disease with severe systolic dysfunction. **Arq Bras Cardiol**, v. 102, n. 3, p. 245-252, 2014.

RIBEIRO, A.L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576, 2012.

RODRIGUES, M.M.; OLIVEIRA, A.C.; BELLIO, M.. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. **J Parasitol**, v. 2012, 2012a.

RODRIGUES, D.B.R. et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, 2012.

ROELL, W. et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 819-824, 2007.

ROJAS, L. Z. et al. Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 6, p. e0006567, 2018.

ROMAN-CAMPOS, D. et al. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Res Cardiol**, v. 104, n. 3, p. 238-246, 2009.

ROSSI, M.A.; RAMOS, S.G.; BESTETTI, R.B. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. **Front Biosci**, v. 8, p. e94-109, 2003.

- SALLES, G. et al. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. **Circulation**, v. 108, n. 3, p. 305-312, 2003.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.
- SILVA, G.K. et al. Apoptosis-associated Speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 $\beta$  response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 191, n. 6, p. 3373-3383, 2013.
- SOKOLOVA, M. et al. NLRP3 inflammasome promotes myocardial remodeling during diet-induced obesity. **Front Immunol**, v. 10, p. 1621, 2019.
- SORDILLO, P.P.; SORDILLO, D.C.; HELSON, L. The prolonged QT Interval: role of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species and the ceramide and sphingosine-1 phosphate pathways. **In Vivo**, v. 29, n. 6, p. 619-636, 2015.
- SOUSA, G. R. et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. **PloS one**, v. 9, n. 3, 2014.
- SZEKELY, Y.; ARBEL, Y. A review of Interleukin-1 in heart disease: where do we stand today?. **Cardiol Therapy**, v. 7, n. 1, p. 25-44, 2018.
- TASSELL, B.W. et al. Enhanced interleukin-1 activity contributes to exercise intolerance in patients with systolic heart failure. **PloS one**, v. 7, n. 3, 2012.
- TASSELL, B.W. et al. Interleukin-1 $\beta$  induces a reversible cardiomyopathy in the mouse. **Inflamm Res**, v. 62, n. 7, p. 637-640, 2013.
- TASSELL, B.W. et al. Interleukin-1 blockade in recently decompensated systolic heart failure: results from REDHART (Recently Decompensated Heart Failure Anakinra Response Trial). **Circ Heart Fail**, v. 10, n. 11, p. e004373, 2017.
- TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.
- THAIK, C.M. et al. Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1093-1099, 1995.
- VASQUEZ, C. et al. Enhanced fibroblast–myocyte interactions in response to cardiac injury. **Circ Res**, v. 107, n. 8, p. 1011-1020, 2010.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M.. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, v. 3, n.105, p. cm1-cm1, 2010.
- YAO, C. et al. Enhanced cardiomyocyte NLRP3 inflammasome signaling promotes atrial fibrillation. **Circulation**, v. 138, n. 20, p. 2227-2242, 2018.
- ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 156-171, 2015.
- ZHOU, W. et al. NLRP3: a novel mediator in cardiovascular disease. **J Immunol Res**. v. 2018, 2018.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

## EIXO CÁLCIO-PTH-VITAMINA D EM PACIENTES COM MALÁRIA NÃO COMPLICADA NO MUNICÍPIO DE ITAITUBA, PARÁ, BRASIL

**Janaina Maria Setto<sup>1</sup>, Rosana Maria Feio Libonati<sup>1</sup>, Ana Maria Revoredo da Silva  
Ventura<sup>2</sup>, Tânia do Socorro Souza Chaves<sup>3</sup>, Carina Guilhon Sequeira<sup>2</sup>, Arnaldo Jorge  
Martins Filho<sup>4</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado<sup>5</sup>, Sylvia do Carmo Castro  
Franceschini<sup>6</sup>**

1. Universidade Federal do Pará (UFPA), Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, Pará, Brasil;
2. Universidade Estadual do Pará (UEPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) - Departamento de Saúde integrada, Belém, Pará, Brasil;
3. Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS); Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina (FAMED); CESUPA, Curso de Medicina, Belém, Pará, Brasil.
4. Instituto Evandro Chagas, Seção de Patologia, Ananindeua, Pará, Brasil;
5. Universidade Federal Fluminense (UFF), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
6. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

O conhecimento da prevalência de deficiência de vitamina D [25(OH)D] e sua relação com a malária é pouco conhecida na Amazônia. Essa pesquisa objetivou avaliar os níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com malária e a correlação entre a deficiência de 25(OH)D e os níveis plasmáticos de cálcio total (Ca), paratormônio (PTH), fósforo (P), fosfatase alcalina (FA), transferases (TGO/AST, TGP/ALT) e parasitemia. Estudo de caso-controle não pareado com avaliação de 25(OH)D, PTH, CA, P, FA, TGO/AST, TGP/ALT e parasitemia em pacientes com malária no município de Itaituba, Pará, Brasil. Testes estatísticos foram utilizados, adotando-se 5% como significância. Participaram 245 indivíduos (123 casos, 122 controle). Sexo masculino, residência em garimpo e idade foram significativos nos pacientes, que apresentaram  $32,3 \pm 11,9$  ng/mL de 25(OH)D. Hipovitaminase D foi similar entre os grupos (28,5% no grupo malária). Os níveis reduzidos de 25(OH)D influenciaram na elevação do PTH. Os níveis séricos de Ca e P foram inferiores e os de FA e TGP/ALT superiores aqueles do grupo controle. O eixo cálcio-PTH-25(OH)D se manteve atuante nos pacientes, evidenciado pela fraca, porém, negativa e significativa correlação entre Ca e PTH e entre 25(OH)D e PTH. A elevação da parasitemia por *P. vivax* influenciou na diminuição dos níveis de P. O aumento das TGO/AST e TGP/ALT influenciaram a elevação dos níveis de FA. Pacientes com malária por *P. vivax* podem apresentar deficiência de vitamina D com aumento do PTH e por essa razão, faz-se necessário avaliar o eixo endócrino Ca-PTH-25(OH)D, além de outros parâmetros

bioquímicos (P, FA, transferases) de interesse, os quais podem estar alterados e desse modo vir a influenciar o curso clínico da doença.

**Palavras-chave:** Malária; Vitamina D e Eixo CA-PTH-25(OH)D.

## ABSTRACT

Knowledge of the prevalence of vitamin D deficiency [25(OH)D] and its relationship to malaria is little known in the Amazon. This research aimed to evaluate the serum levels of 25(OH)D in patients with malaria and the correlation between 25(OH)D deficiency and plasma levels of total calcium (Ca), parathormone (PTH), phosphorus (P), alkaline phosphatase (AF), transferases (TGO/AST, TGP/ALT) and parasitemia. This is an unpaired case-control study with evaluation of 25(OH)D, PTH, CA, P, FA, TGO/AST, TGP/ALT and parasitemia in patients with malaria in the municipality of Itaituba, Pará, Brazil. Statistical tests were used, adopting 5% as significance. 245 individuals participated (123 cases, 122 control). Male gender, residing in mining and age were significant in patients, who had  $32,3 \pm 11,9$  ng/mL of 25(OH)D. Hypovitaminosis D was similar between groups (28.5% in malaria group). Reduced levels of 25(OH)D influenced PTH increase. Serum levels of Ca and P were lower while AF and TGP/ALT were higher than those of the control group. Calcium-PTH-25(OH)D axis remained active in the patients, evidenced by the weak, however, negative and significant correlation between Ca and PTH and between 25(OH)D and PTH. *P. vivax* parasitemia increase influenced P levels decrease. TGO/AST and TGP/ALT increase influenced the AF levels. Patients with *P. vivax* malaria may have vitamin D deficiency with PTH increase and for this reason, it is necessary to evaluate Ca-PTH-25(OH)D endocrine axis, in addition to other biochemical parameters (P, AF, transferases) of interest, which may be altered and thereby influence the clinical course of the disease.

**Keywords:** Malaria, D vitamin and CA-PTH-25(OH)D Axis.

## 1. INTRODUÇÃO

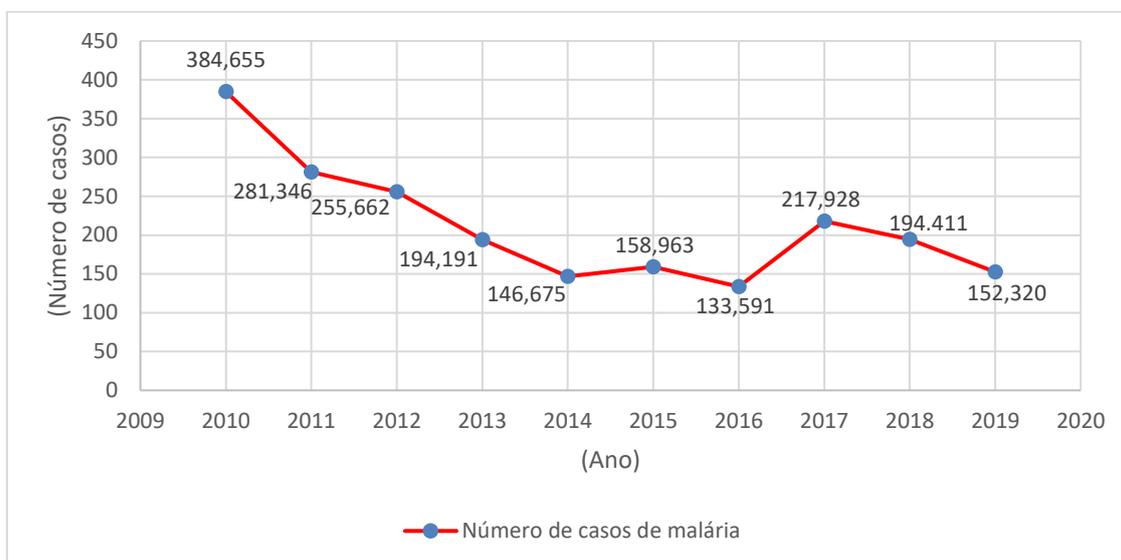
A malária é uma das doenças parasitárias de maior impacto na saúde pública, destacando-se como uma das principais causas de morbimortalidade e anemia no mundo (OPAS, 2016; VENTURA et al., 2018). É uma doença febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (NEVES et al., 2011).

De acordo com a World Health Organization (WHO), após um significativo declínio da malária no período de 2010 (239 milhões de casos) a 2015 (214 milhões de casos), houve um representativo aumento da incidência nos últimos três anos, atingindo em 2018 o equivalente à 228 milhões de casos (WHO, 2019).

Quanto à mortalidade, em 2018 foram cerca de 405 mil óbitos, apresentando uma redução em relação a 2017 (416 mil óbitos) e 2010 (585 mil óbitos) (WHO, 2019).

No Brasil, a situação epidemiológica apresentada pela WHO, também indicou um avanço da doença na região Amazônica, área considerada endêmica. Na figura 1, observa-

se que em 2019 foram registrados 152.320 casos de malária, o que representa um aumento de 14,02% em relação a 2016 (133.591 casos) (WHO, 2018a; BRASIL, 2020).



**Figura 1.** Evolução do número de casos de malária no Brasil, 2010 a 2019.  
Fonte: BRASIL, 2019.

No mundo, em 2018, registraram-se cerca de 405 mil óbitos por malária, ligeiramente inferior aos 416 mil óbitos em 2017. Em 2010, a WHO reportou 585 mil óbitos por essa doença (WHO, 2019). No Brasil, os óbitos pela doença se mantêm em patamares estáveis: 37 óbitos em 2017, 35 óbitos em 2015 (WHO, 2018b).

No Brasil, a área endêmica de malária encontra-se na região da Amazônia Legal, composta por nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins) e 808 municípios. Essa região é responsável por 99,0% dos casos autóctones do país (BRASIL, 2019). A Região Extra-Amazônica é composta pelos outros 17 estados e Distrito Federal, sendo responsável por apenas 1,0% dos casos (BRASIL, 2019).

No município de Itaituba, estado do Pará, Brasil, semelhante as demais regiões endêmicas do país, ocorreu aumento da incidência de malária. Em 2019 (janeiro a outubro), registrou-se 2.816 casos de malária, expressivamente superior os 1.929 casos em 2016. Em 2017, o município teve índice parasitário anual (IPA) de 21,2, considerado área de médio risco para malária (BRASIL, 2018).

A malária é causada por protozoários da ordem *Haemosporidia*, família *Plasmodidae*, gênero *Plasmodium*. Atualmente, são conhecidas cerca de 150 espécies

causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que seis espécies infectam os humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium* (BRASIL, 2017; BRASIL et al., 2017).

No Brasil, as espécies associadas à malária em seres humanos são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Em 2017, os casos predominantes foram por *P. vivax* (90,0%) e *P. falciparum* (10,0%) (WHO, 2018a).

A infecção por *P. ovale* está restrita à determinadas regiões do continente africano e a casos importados de malária no Brasil. Enquanto que a infecção por *P. Knowlesi*, um parasito de macacos e humanos no Sudeste Asiático, foi considerada a quinta espécie de malária (BRASIL, 2017). Uma sexta espécie, é o *P. simium* que parasita macacos, foi identificada como a espécie que causou malária em humanos na Mata Atlântica no Rio de Janeiro, no período de 2015 e 2016 (BRASIL et al., 2017).

O principal reservatório da malária é o homem, que também é considerado hospedeiro intermediário (BRASIL, 2017).

O hospedeiro definitivo são os mosquitos pertencentes à ordem *Diptera*, infraordem *Culicomorpha*, família *Culicidae*, gênero *Anopheles* (BRASIL, 2010). A transmissão natural da malária ocorre através da picada de mosquito fêmea, do gênero *Anopheles*, quando infectado pelo *Plasmodium spp.* (BRASIL, 2017).

Apesar de raras, outras formas de transmissão são a transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas contaminadas e transmissão congênita. Não há transmissão direta da malária entre humanos (BRASIL, 2017).

O período de incubação da malária é em média 14 dias, podendo variar de acordo com espécie e região onde ocorre a infecção. Esse período para o *P. falciparum* varia de 8 a 12 dias, *P. vivax* de 13 a 17 dias e *P. malariae* de 18 a 30 dias (BRASIL, 2017).

A febre é a principal manifestação clínica da malária, em geral, acompanhada de outras manifestações, tais como, mal-estar, anorexia, anemia, sinais e sintomas respiratórios, do trato gastrointestinal, hepatomegalia, esplenomegalia, dentre outras (WHITE et al., 2014). O paroxismo malárico (febre, calafrios seguidos de sudorese) tem relação com o ciclo biológico do parasito (BRASIL, 2017).

O grau de imunidade do indivíduo à malária induz um *status* parcial de proteção, sendo responsável pelo quadro clássico da malária (observada com mais frequência naqueles com infecção primária), formas oligossintomáticas ou mesmo assintomáticas da doença (principalmente naqueles com infecções repetidas pelo plasmódio). A malária não

confere imunidade duradoura. Os indivíduos que possuem imunidade parcial, adquirida pelas exposições repetidas ao vetor infectado pelo plasmódio em áreas endêmicas, perdem ao longo dos anos essa imunidade ao se afastarem para áreas não endêmicas. Esses indivíduos, ao regressarem para os locais onde ocorre malária, costumam apresentar todo o corolário clínico da doença (BRASIL, 2017).

O período toxêmico compreende a evolução do paciente para forma grave e complicada, nas quais se inclui a malária cerebral, anemia grave, complicações respiratórias e renais, na dependência, como já citado, pela resposta imunológica do organismo, do aumento da parasitemia e espécie de plasmódio, além da não realização de tratamento específico no momento adequado e oportuno (GAZZINELLI et al., 2014; BRASIL, 2017). São sinais e sintomas de malária grave e/ou complicada: dor abdominal intensa, icterícia, mucosas hipocoradas, oligúria (<400 mL em 24 horas), vômitos persistentes, hemorragia, dispneia, cianose, taquicardia, convulsão, desorientação, prostração (crianças), comorbidades descompensadas, anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal e hiperlactatemia. A hiperparasitemia (>250.000/mm<sup>3</sup> para *P. falciparum*) pode estar presente na malária grave e/ou complicada (WHO, 2015).

A evolução clínica da malária com complicações e mesmo óbito, guarda relação com fatores relativos ao hospedeiro como imunidade prévia ao parasito, idade, associações com comorbidades agudas e crônicas, desnutrição, fatores ambientais, fatores do parasito e intensidade de transmissão do plasmódio (LACERDA et al., 2012; WHITE et al., 2014).

O diagnóstico rápido e tratamento correto são as formas mais efetivas para interromper a cadeia de transmissão, reduzir a gravidade e letalidade da malária. O diagnóstico laboratorial é realizado a partir da análise de sangue periférico para identificação do parasito ou antígenos relacionados. Os exames específicos para malária são gota espessa (padrão-ouro), esfregaço delgado, testes diagnósticos rápidos e diagnóstico por técnicas moleculares (BRASIL, 2017).

A WHO recomenda começar tratamento assim que os sinais e sintomas da malária se iniciam e que o diagnóstico seja confirmado. Para que o tratamento seja eficiente é necessário determinar a gravidade, espécie do plasmódio, idade do paciente, histórico de infecção malárica anterior e susceptibilidade do parasito aos antimaláricos convencionais (BRASIL, 2010).

A evolução clínica da malária pode sofrer interferência de alguns micronutrientes como vitamina A, carotenóides (precursores da vitamina A), vitamina B1 (tiamina), zinco e

ferro (GRANT et al., 2012; OLNEY et al., 2013; OWUSU-AGYEI et al., 2013; WESSELLS et al., 2014).

A vitamina D [25(OH)D ou colecalciferol] é um pré-hormônio essencial em várias funções relacionadas ao metabolismo ósseo, regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea (CASTRO, 2011). A deficiência de vitamina D em crianças pode levar ao retardo do crescimento e raquitismo. Nos adultos essa deficiência pode levar à osteomalácia, hiperparatiroidismo secundário e, conseqüentemente, o aumento da reabsorção óssea que favorece a perda de massa óssea com desenvolvimento de osteopenia e osteoporose, que associado à fraqueza muscular favorecem o risco de quedas e fraturas ósseas (VAN SCHOOR; LIPS, 2011).

Algumas pesquisas sugerem que a vitamina D tem papel importante na infecção malárica (CUSICK et al., 2014; HE et al., 2014; LUONG; NGUYÊN, 2015). Inclusive em associação com malária grave em crianças de Uganda, África, em que os autores verificaram que para cada aumento de 1 ng/mL de 25(OH)D no plasma, a probabilidade de ter malária grave diminuiu 9,0% (CUSICK et al., 2014).

Conforme Sautet et al. (1957), no estudo realizado com camundongos infectados por *P. berghei*, verificaram que a taxa de sobrevivência foi maior com adição de óleo de fígado de bacalhau ou 25(OH)D na dieta, associado ao fosfato dicálcico e quinina. Sergacheva et al. (1986) identificaram que altos níveis de 25(OH)D reduziram a capacidade do *P. berghei* em penetrar na membrana do eritrócito.

Em modelos animais experimentais de malária cerebral, os eventos neuropatológicos estão associados a uma intensa resposta inflamatória e sequestração de leucócitos e eritrócitos parasitados no cérebro. A administração oral de vitamina D em camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. berghei anka* teve um efeito protetor ao ser capaz de reduzir a resposta inflamatória sistêmica e a ocorrência de comprometimento cerebral nesse modelo animal. Nesse experimento, os autores (HE et al., 2014) observaram diminuição dos níveis circulantes de IFN- $\gamma$  e de TNF, com sua menor expressão em células do baço, além de uma autorregulação positiva de células T regulatórias e de IL-10. A diferenciação, ativação e maturação de células dendríticas apresentadoras de antígeno no baço também tiveram ação inibida pela vitamina D. A nível cerebral, esse pré-hormônio foi capaz de induzir a redução da expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e das moléculas de citadesão (ICAM-1, VCAM-1 e CD36) com conseqüente diminuição do acúmulo de células T patogênicas nesse sítio, além de promover um incremento nas barreiras sanguíneas desse órgão aos eritrócitos infectados pelo plasmódio.

A prevalência de deficiência de 25(OH)D é elevada em diversos grupos etários da população brasileira (MAEDA et al., 2014) e está associada a várias doenças agudas, tais como tuberculose, sepse, infecções por vírus (vírus da imunodeficiência adquirida-HIV, *Epstein Barr*), infecções do trato respiratório, parasitária e fúngicas KIM et al., 2014; HAAN et al., 2014; LIM et al., 2015; TOKO; SUMBA, 2016; BRANCE et al., 2018).

A malária é a doença infecciosa de maior impacto na população amazônica (BRASIL, 2017) e a prevalência de deficiência de vitamina D nessa população e sua relação com a malária ainda é pouco conhecida, o que justificou a realização desta pesquisa, com o objetivo de avaliar os níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com malária, a correlação entre deficiência de 25(OH)D e níveis plasmáticos de Paratormônio (PTH), Cálcio total (Ca), Fósforo (P), Fosfatase alcalina (FA), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/AST), Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT) e parasitemia.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 TIPO DE ESTUDO E LOCAL

Foi desenvolvido o estudo de caso-controle não pareado com pacientes com diagnóstico positivo para malária (gota espessa), atendidos no Hospital Municipal de Itaituba, cidade localizada na região sudoeste do estado do Pará, Brasil.

O grupo controle foi composto por indivíduos que se autodeclararam saudáveis, com diagnóstico negativo para malária (gota espessa) e residentes no município de Itaituba/PA.

### 2.2 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Para registro das informações dos participantes foi elaborado um Protocolo de Coleta de Dados, cujo preenchimento foi realizado pelos membros da equipe da pesquisa.

### 2.3 AMOSTRA

O cálculo amostral foi realizado no programa *BioEstat 5.0*, utilizando Teste Proporção: Duas Amostras, com poder do teste de 80,0% e nível *alfa* de 0,05. Para o cálculo

amostral, considerou-se a prevalência de deficiência de 25(OH)D de 30,0% em pacientes com malária e 15,0% sem malária (CUSICK et al., 2014), e incidência de malária no município de Itaituba no ano de 2015 (2.521 casos). Ao número de 121 obtido no cálculo amostral, acrescentaram-se 10,0% para possíveis perdas de seguimento, totalizando “n” de 133 casos e 133 controles.

Participaram da pesquisa os pacientes com diagnóstico positivo para malária (gota espessa), sexo masculino e feminino, idade  $\geq 19$  a 59 anos, causada por qualquer espécie de *Plasmodium*, atendidos no Hospital Municipal de Itaituba, PA. O grupo controle foi composto por indivíduos que se autodeclararam saudáveis, com diagnóstico negativo para malária (gota espessa), sexo masculino e feminino, idade  $\geq 19$  a 59 anos, residentes no município de Itaituba/PA.

Os critérios de exclusão adotados foram: indivíduos em suplementação de 25(OH)D ou cálcio; uso de anticonvulsivante, isoniazida, anti-histamínico, colestiramina, rifampicina, corticoides, heparina; portadores de insuficiência renal crônica; níveis de ureia e/ou creatinina além dos limites de normalidade; malária grave (cerebral, anemia grave, complicações respiratórias e renais) e gestantes.

## 2.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Neste estudo a deficiência de 25(OH)D se constituiu como variável dependente e os dados sociodemográficos (sexo, etnia, escolaridade, estado civil, residência no garimpo, idade) como variáveis independentes para os pacientes com malária. Os níveis plasmáticos de Paratormônio (PTH), Cálcio total (Ca), Fósforo (P), Fosfatase alcalina (FA), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO/AST), Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP/ALT) e parasitemia foram correlacionados entre os grupos caso e controle.

## 2.5 DIAGNÓSTICO MICROSCÓPIO

Realizou-se a pesquisa de plasmódio no sangue periférico pela técnica de gota espessa, padrão-ouro para diagnóstico e monitoramento do tratamento da malária. Esse exame detecta e permite diferenciação das espécies de plasmódio, estágio de evolução e determina a densidade da parasitemia (parasitos/mm<sup>3</sup>) (BRASIL, 2009).

## 2.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Coletou-se de cada paciente e de cada controle 10 mL de sangue venoso em tubos com gel para obtenção do soro em centrífuga refrigerada e posterior preparo de alíquotas que foram armazenadas (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) para análise dos níveis séricos de 25(OH)D, PTH, Ca, P, FA, TGO/AST e TGP/ALT no Laboratório de Bioquímica da Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA.

Valores séricos  $>20$  ng/mL foram definidos como normais de 25(OH)D, deficiente se  $\leq 20$  ng/mL e toxicidade  $>100$  ng/mL (SBEM, 2017), utilizando-se para essa finalidade o kit VIDAS® 25-OH-Vitamin D Total, com emprego da técnica ELFA (Teste Imunoenzimático por Fluorescência) (BIOMÉRIEUX, 2015).

Para os níveis séricos de PTH (normal de 18,5-80,1 pg/mL) utilizou-se o kit Ensaio ADVIA Centaur® PTH intacta (SIEMENS, 2018), empregando o método de imunoensaio com tecnologia quimioluminométrica direta.

Os demais exames bioquímicos foram realizados com o Kit Cobas, Integra 400 plus (Roche), pelo método de espectrofotometria e/ou turbidimetria, considerando-se os seguintes valores de referência: cálcio sérico total: 8,6-10,2 mg/dL; fósforo sérico: 2,7-4,5 mg/dL; fosfatase alcalina: 38,0-126,0 U/L; TGO/AST: 5-40 U/L e TGP/ALT: 2-41 U/L (LABORATÓRIO DE PATOLOGIA/IEC, 2018).

Os resultados laboratoriais dos exames solicitados foram entregues aos participantes do estudo. Caso estivessem alterados, os pacientes eram encaminhados para atendimento médico no Centro de Estratégia de Saúde da Família de Itaituba.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi elaborado com dupla digitação, no Microsoft Office Excel 2007 e para análises estatísticas foram utilizados os programas BioEstat 5.0 (2007), programa Epi Info 3.5.2 (2010), programa SPSS Statistics 17.0 (2010). Para as variáveis categóricas verificou-se frequência simples e relativa, para as variáveis contínuas, média e desvio-padrão (DP) ou mediana e desvio-interquartil (DI).

Nas variáveis qualitativas empregaram-se os testes Qui-quadrado de Pearson, Exato de Fisher ( $n \leq 5$ ) e Teste G. Na comparação das variáveis quantitativas foram utilizados os testes t Student (paramétricos), média e desvio-padrão para variáveis de distribuição normal, e Mann-Whitney (não-paramétricos), mediana e desvio-interquartil para variáveis

de distribuição livre. Considerou-se para nível de significância estatística os valores de  $p \leq 0,05$ .

O teste D' Agostino-Pearson (K amostras) foi utilizado para avaliar normalidade das variáveis quantitativas [idade, 25(OH)D, PTH, Ca, P, FA, TGO/AST, TGP/ALT e parasitemia]. A Correlação Linear de Pearson foi usada para avaliar os níveis de 25(OH)D com as variáveis quantitativas paramétricas, e a Correlação Linear de Spearman para variáveis não-paramétricas.

A análise de regressão múltipla foi realizada para identificar fatores associados à deficiência de 25(OH)D entre os casos e controles. O critério definido para inclusão das variáveis na regressão múltipla foi a relação com a variável dependente ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.9 ASPECTOS ÉTICOS

Os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, Brasil. A pesquisa foi submetida à Plataforma Brasil sob o número CAAE 73007317.4.0000.5172, com aprovação do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA (parecer CEP Nº 2.420.183, em 06/12/2017) e do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA (CEP Nº 2.974.069, em 22/10/2018).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 RESULTADOS

Participaram da pesquisa 272 indivíduos, sendo excluídos 27 indivíduos devido às perdas de seguimento e ajustes da amostra. O período da pesquisa foi de janeiro de 2018 a outubro de 2019.

A tabela 1 apresenta a distribuição de características sociodemográficas da amostra de 245 indivíduos (123 com malária e 122 no grupo controle), em que se observa que o sexo masculino e residência em garimpo foram significativamente mais frequentes no grupo com malária que no controle ( $p < 0,001$ , respectivamente).

**Tabela 1.** Características sociodemográficas dos casos de malária e controle, Itaituba, PA, Brasil, no período de 2018 a 2019.

|                              | Caso (n= 123) | Controle (n= 122) | p (valor)          |
|------------------------------|---------------|-------------------|--------------------|
|                              | n (%)         | n (%)             |                    |
| <b>Sexo</b>                  |               |                   |                    |
| Masculino                    | 86 (69,9)     | 58 (47,5)         | <b>&lt;0,001*</b>  |
| Feminino                     | 37 (30,1)     | 64 (52,5)         |                    |
| <b>Etnia</b>                 |               |                   |                    |
| Branco                       | 18 (14,6)     | 27 (22,1)         | 1,00***            |
| Pardo                        | 84 (68,3)     | 80 (65,6)         |                    |
| Negro                        | 20 (16,3)     | 13 (10,7)         |                    |
| Indígena                     | 1 (0,8)       | 2 (1,6)           |                    |
| <b>Escolaridade</b>          |               |                   |                    |
| Ensino superior              | 2 (1,6)       | 26 (21,3)         | 1,00***            |
| Pós-graduação                | -----         | 4 (3,3)           |                    |
| Ensino médio                 | 39 (31,7)     | 46 (37,7)         |                    |
| Ensino fundamental           | 82 (66,7)     | 45 (36,9)         |                    |
| Analfabeto                   | -----         | 1 (0,8)           |                    |
| <b>Estado Civil</b>          |               |                   |                    |
| Casado/reside com alguém     | 69 (56,1)     | 73 (59,8)         | 1,00***            |
| Separado/divorciado/viúvo    | 4 (3,3)       | 6 (4,9)           |                    |
| Solteiro                     | 50 (40,7)     | 43 (35,2)         |                    |
| <b>Residência no Garimpo</b> |               |                   |                    |
| Sim                          | 119 (96,7)    | 31 (25,4)         | <b>&lt;0,001**</b> |
| Não                          | 4 (3,3)       | 91 (74,6)         |                    |

\*, Qui-quadrado de Pearson; \*\*, Exato Fisher; \*\*\*, Teste G.

No grupo com malária, observou-se que 91,9% (113/123) foram causados por *P. vivax* e 8,1% (10/123) por *P. falciparum*. A mediana da parasitemia por *P. vivax* ( $3.500 \pm 6.000$  parasitos/mm<sup>3</sup>) foi maior do que por *P. falciparum* ( $1.500 \pm 2.850$  parasitos/mm<sup>3</sup>), sem diferença estatística.

Nos pacientes com malária, a média de idade e DP ( $33,7 \pm 9,9$  anos) foi significativamente menor que no grupo controle ( $39,9 \pm 9,7$  anos) ( $p < 0,001$ ).

Na tabela 2 observam-se os parâmetros bioquímicos dos casos de malária e do grupo controle: os níveis séricos de Ca (mediana) e P (mediana) foram significativamente menores naqueles com malária e aqueles de FA (média), TGP/ALT (mediana) significativamente maiores ( $p < 0,001$ ).

A vitamina D teve média menor nos pacientes com malária ( $32,3 \pm 11,9$  ng/mL) que no grupo controle ( $34,7 \pm 11,5$  ng/mL) (normal:  $>20$  ng/mL), sem diferença estatística. A prevalência de hipovitaminose D foi similar entre os pacientes com malária (28,5%; 35/123) e aqueles sem malária (24,6%; 30/122).

**Tabela 2.** Parâmetros bioquímicos dos casos de malária e controle, Itaituba, PA, Brasil, no período de 2018 a 2019.

|                 | Caso (n= 123)                  | Controle (n= 122)              | p (valor) |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|
|                 | Média ± DP †<br>Mediana ± DI ‡ | Média ± DP †<br>Mediana ± DI ‡ |           |
| 25(OH)D (ng/mL) | $32,3 \pm 11,9$ †              | $34,7 \pm 11,5$ †              | 0,11*     |
| PTH (pg/mL)     | $20,1 \pm 14,6$ †              | $19,8 \pm 15,3$ †              | 0,87*     |
| Ca (mg/dL)      | $9,3 \pm 0,6$ ‡                | $9,5 \pm 0,5$ ‡                | <0,001**  |
| P (mg/dL)       | $2,9 \pm 1,1$ ‡                | $3,6 \pm 1,0$ ‡                | <0,001**  |
| FA (U/L)        | $94,3 \pm 34,7$ †              | $79,6 \pm 33,2$ †              | <0,001*   |
| TGO/AST (U/L)   | $22 \pm 16$ ‡                  | $21 \pm 14$ ‡                  | 0,29**    |
| TGP/ALT (U/L)   | $19 \pm 19$ ‡                  | $16 \pm 16$ ‡                  | <0,001**  |

25(OH)D, Vitamina D; PTH, Paratormônio; Ca, Cálcio sérico total; P, Fósforo sérico; FA, Fosfatase alcalina; TGO/AST, Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP/ALT, Transaminase glutâmico pirúvica; †, Média ± desvio-padrão; ‡, Mediana ± desvio-interquartil; \*, teste t Student; \*\*, teste de Mann-Whitney.

Na tabela 3, observa-se que os pacientes com malária apresentaram correlação inversa (ainda que fraca) entre os níveis de PTH e 25(OH)D e entre o PTH e cálcio sérico total, isto é, quanto menores os níveis de 25(OH)D e cálcio sérico total, maiores os níveis de PTH [ $F = 9,63$  (2-120);  $p < 0,001$ ;  $R^2 = 0,14$ , correlação linear de Spearman]. No modelo

de regressão linear múltipla, verificou-se que a 25(OH)D e o cálcio sérico total atuaram como preditores independentes para o PTH. Esse modelo contribuiu com 14,0% da variação dos níveis de PTH.

Nos pacientes com malária por *P. vivax*, verifica-se correlação inversa (ainda que fraca) entre a parasitemia e os níveis de fósforo sérico, ou seja, quanto maior a parasitemia, menores os níveis de fósforo sérico [ $F= 5,82$  (1-110);  $p < 0,016$ ;  $R^2= 0,05$ , correlação linear de Spearman]. No modelo de regressão linear simples, observou-se que a parasitemia se comportou como preditor independente para o fósforo sérico. Nesse modelo, a parasitemia contribuiu com 5,0% da variação dos níveis de fósforo sérico.

Nesta casuística, observa-se prevalência de hipofosfatemia de 34,5% (39/113) nos pacientes com malária por *P. vivax* e de 10,0% (1/10) por *P. falciparum*, sem diferença estatística. Nos pacientes com malária, não foi observada a associação entre os níveis de cálcio sérico total e fósforo sérico (correlação linear de Spearman). Na malária por *P. falciparum* não foi observada correlação entre a parasitemia e os níveis de fósforo sérico (correlação linear de Spearman).

Observa-se ainda na tabela 3, que os pacientes com malária, apresentaram associação positiva (ainda que fraca) entre os níveis de fosfatase alcalina e TGO/AST e entre fosfatase alcalina e TGP/ALT, isto é, quanto maior os níveis de TGO/AST e TGP/ALT, maiores os níveis de fosfatase alcalina [ $F= 49,76$  (2-120);  $p < 0,001$ ;  $R^2= 0,45$ , correlação linear de Spearman]. No modelo de regressão linear múltipla, verificou-se que os níveis de TGO/AST e TGP/ALT foram preditores independentes para a fosfatase alcalina. Esse modelo contribuiu com 45,0% dos níveis de fosfatase alcalina.

Na tabela 4, observa-se que o grupo controle apresentou correlação inversa (ainda que fraca) entre os níveis de PTH e cálcio sérico total e entre PTH e idade, ou seja, quanto menor os níveis de cálcio sérico total e maior a idade, maiores os níveis séricos do PTH [ $F= 13,74$  (2-119);  $p < 0,001$ ;  $R^2= 0,19$ , correlação linear de Spearman]. Na regressão linear múltipla, os níveis de cálcio sérico total e a idade se comportaram como preditores independentes para o PTH. Esse modelo contribuiu com 19,0% da variação dos níveis de PTH.

Verifica-se que o grupo controle, apresentou a associação positiva fraca entre o cálcio sérico total e fósforo sérico, isto é, quanto maiores os níveis de fósforo sérico, maiores os níveis de cálcio sérico total [ $F= 7,22$  (1-120);  $p= 0,008$ ;  $R^2= 0,06$ , correlação linear de Pearson]. Na regressão linear simples, o fósforo sérico se apresentou como preditor

independente para o cálcio sérico total. Esse modelo contribuiu com 6,0% dos níveis de cálcio sérico total.

**Tabela 3.** Preditores de PTH, fósforo sérico e fosfatase alcalina de casos de malária, Itaituba, PA, Brasil, no período de 2018 a 2019.

| Caso (n= 123) |                                    |          |       |         |                |
|---------------|------------------------------------|----------|-------|---------|----------------|
|               | Variáveis                          | Coef. C. | F     | p-valor | R <sup>2</sup> |
| PTH           | 25(OH)D                            | -0,433*  | 9,63  | <0,001  | 0,14           |
|               | Ca                                 | -0,333*  |       |         |                |
| P             | Parasitemia<br>( <i>P. vivax</i> ) | -0,332*  | 5,82  | 0,016   | 0,05           |
| FA            | TGO/AST                            | 0,390*   | 49,76 | <0,001  | 0,45           |
|               | TGP/ALT                            | 0,403*   |       |         |                |

PTH, Paratormônio; 25(OH)D, Vitamina D; Ca, Cálcio sérico total; P, Fósforo sérico; FA, Fosfatase alcalina, TGO/AST, Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP/ALT, Transaminase glutâmico-pirúvica; Coef. C., Coeficiente de Correlação; \*, Correlação Linear de Spearman; F, Coeficiente de regressão; R<sup>2</sup>, Regressão Linear univariada e multivariada.

**Tabela 4.** Preditores de PTH e cálcio sérico total do grupo controle, Itaituba, PA, Brasil, no período de 2018 a 2019.

| Controle (n= 122) |           |          |       |         |                |
|-------------------|-----------|----------|-------|---------|----------------|
|                   | Variáveis | Coef. C. | F     | p-valor | R <sup>2</sup> |
| PTH               | Ca        | -0,348*  | 13,74 | <0,001  | 0,19           |
|                   | IDADE     | 0,252*   |       |         |                |
| Ca                | P         | 0,302**  | 7,22  | 0,008   | 0,06           |

PTH, Paratormônio; Ca, Cálcio sérico total; P, Fósforo sérico; Coef. C., Coeficiente de Correlação; \*, Correlação Linear de Spearman; \*\*, Correlação Linear de Pearson; F, Coeficiente de regressão; R<sup>2</sup>, Regressão Linear univariada e multivariada.

### 3.2 DISCUSSÃO

No grupo com malária houve predomínio do sexo masculino (69,9%), semelhante ao observado (71,9%) por Lopes et al. (2019) em um estudo ecológico/prospectivo (2011-

2015) realizado no mesmo local desta pesquisa, município de Itaituba, justificado pela atividade econômica aí predominante- exploração de garimpos - atividade laboral exercida, principalmente, por esse gênero (CONFALONIERI, 2005; REISEN, 2010; MACIEL; OLIVEIRA, 2014; IBGE, 2017). Ademais, a malária pela sua íntima associação com atividade profissional em outras partes do Brasil (PARISE et al., 2012) e mesmo de forma universal, é mais frequente entre homens do que entre mulheres (YADAV et al., 2007; NOROUZINEJAD et al., 2016).

Quase a totalidade dos pacientes (96,7%) referiram residir em garimpos. A extração de recursos naturais pela exploração de ouro e/ou diamantes ao lado de outras atividades, tais como madeireiras e graneleira, determinam importantes alterações no meio ambiente, ocasionando desequilíbrio ecológico o que facilita a interação do homem suscetível e vetor infectado pelo plasmódio (CONFALONIERI, 2005; REISEN, 2010).

A maioria dos indivíduos com malária possuía baixa escolaridade, com 66,7% apenas com ensino fundamental, em conformidade com outros estudos brasileiros (LOPES et al., 2019; LIMA, 2019). O nível de escolaridade do indivíduo guarda relação com o processo saúde-doença, em que, quanto menor for seu acesso à informação e ao conhecimento, menor será sua adesão às medidas de promoção da saúde e prevenção de doenças (CATRAIO et al., 2013).

A média de idade dos pacientes com malária foi de  $33,7 \pm 9,9$  anos, ou seja, na faixa economicamente ativa da população, como também já observado por outros autores (COUTO et al., 2010; LOPES et al., 2019).

Por ser o *P. vivax* a principal espécie que causa malária no Brasil (BRASIL, 2017), o encontro dessa espécie foi a mais frequente (91,3%), do mesmo modo como observado por outros autores em estudos nacionais (PARISE et al., 2012, LOPES et al., 2019; LIMA, 2019).

Identificou-se prevalência similar de hipovitaminose D no grupo de pacientes (28,5%) e no grupo controle (24,6%) e, portanto, sem que se observasse associação da hipovitaminose D e infecção malárica, em contraponto aos resultados de autores que salientam o papel da 25(OH)D nessa doença (HE et al., 2014; LUONG; NGUYÊN, 2015).

Em Uganda, na África, um estudo com 60 crianças na faixa etária de 18 meses a 12 anos, das quais 40 com malária grave (anemia grave ou malária cerebral) e 20 sem malária, observou percentual elevado de deficiência de 25(OH)D em ambos os grupos (respectivamente 95% e 80%), com destaque para níveis significativamente menores de 25(OH)D naquelas com malária grave. Ademais, usando modelo de regressão logística, os

autores concluíram que para cada 1 ng/mL de aumento plasmático de 25(OH)D a chance de ter malária grave declinava 9,0%, embora salientassem ser esses resultados preliminares, que necessitavam de investigação de casualidade entre vitamina D e gravidade da malária em uma amostra com maior número de crianças (CUSICK et al, 2014).

Os indivíduos com malária apresentaram a mediana de Ca (9,3 mg/dL) e P (2,9 mg/dL) dentro dos valores de referência, porém, em níveis menores se comparados aqueles observados no grupo controle (tabela 2). A não realização de uma dosagem subsequente desses íons, principalmente, no grupo com malária (para verificar seu comportamento após o tratamento da doença) dificulta a interpretação desses resultados com a literatura, em que se observa ser a hipocalcemia comum em pacientes com malária (DAVIS et al., 1991; DAVIS et al., 1998; LUONG, NGUVÊN; 2015, SIROMA et al., 2016). Inclusive com valor prognóstico para as formas graves da doença - a normalização do cálcio sérico pode sinalizar recuperação clínica e redução da parasitemia (PRABHA et al., 1998).

A média dos níveis séricos de PTH nos pacientes com malária foi de 20,1 pg/mL, e, portanto, dentro dos valores de referência, sem diferença estatística em relação ao controle (tabela 2). O eixo cálcio-PTH-25(OH)D estava normal nos pacientes desta casuística, provavelmente, porque a deficiência de 25(OH)D foi observada em um percentual pequeno de pacientes (28,5%) e o Ca estar em níveis normais. Esse resultado converge com o encontrado por alguns autores (DAVIS et al., 1993; DAVIS et al. 1998; ST JOOHN, et al. 1995), que observaram uma resposta normal do PTH à hipocalcemia leve na malária aguda não complicada e em casos graves sem insuficiência renal. Diferente disso, o estudo de Davis et al. (1991), observou a diminuição anormal do eixo cálcio-PTH-25(OH)D nos pacientes com malária *falciparum*.

Observou-se que o mecanismo de *feedback* negativo entre Ca e PTH se manteve preservado nos pacientes com malária, corroborado pela fraca, mas significativa correlação entre esse íon e esse hormônio (tabela 3), em conformidade com as observações de McDowell (1992) que ratifica esse mecanismo de *feedback* negativo: aumento imediato da liberação do PTH na vigência de redução do cálcio e/ou da relação diminuída de cálcio e fósforo, a fim de manter o equilíbrio do eixo cálcio-PTH-25(OH)D.

Apesar da observação de um percentual pequeno de deficiência de 25(OH)D, o *feedback* negativo entre a 25(OH)D e o PTH se manteve preservado nos pacientes com malária, corroborado pela fraca, mas significativa, correlação negativa entre essas duas variáveis (tabela 3), mantendo normal o eixo cálcio-PTH-25(OH)D. Esse resultado converge com as observações da SBEM quanto a fisiologia do metabolismo ósseo, indicando que a

vitamina D modula a síntese de PTH (MAEDA et al., 2014). Nos estudos realizados em pacientes com malária aguda não complicada e casos graves sem insuficiência renal, observou-se que a hipocalcemia leve provocou o estímulo normal do PTH (DAVIS et al., 1993; ST JOOHN, et al. 1995; DAVIS et al. 1998).

A mediana dos níveis séricos de P nos pacientes com malária foi de 2,9 mg/dL, e, portanto, dentro dos valores de referência. Todavia, apresentaram valores significativamente menores que o grupo controle (tabela 2). A prevalência de hipofosfatemia foi maior nos pacientes com malária por *P. vivax* (34,5%) do que por *P. falciparum* (10,0%), sem diferença estatística. Na malária por *P. vivax*, a correlação negativa (ainda que fraca) entre a parasitemia e os níveis de P, justificam a redução dos níveis desse íon quando comparado aqueles do grupo controle (tabela 3) e reflete a influência da elevação da parasitemia na hipofosfatemia. Esse resultado converge com o encontrado por Davis et al. (1991), que observaram que é comum a presença da hipofosfatemia em pacientes com malária *P. falciparum*, porém, salientaram que isso pode indicar gravidade no quadro clínico. Siroma et al. (2016) observaram a hipofosfatemia na malária grave por *P. vivax*. Os pacientes com malária por *P. falciparum*, não apresentaram correlação negativa entre a parasitemia e os níveis de P, provavelmente porque a hipofosfatemia foi observada em um percentual pequeno de pacientes (10,0%) nesta pesquisa.

Nesta casuística, a correlação negativa entre Ca e PTH manteve a normalidade do eixo Ca-PTH-25(OH)D, ou seja, houve o aumento dos níveis de PTH para corrigir a hipocalcemia, em conformidade com as observações dos autores Davis et al. (1998), que ratificam que existe uma há resposta normal do PTH à hipocalcemia aguda na malária. Observa-se que o aumento de PTH, possivelmente, influenciou na redução dos níveis de fósforo sérico nos pacientes com malária por *P. vivax* não complicada, convergindo com as observações de outros autores (LIMA; NÓBREGA; NÓBREGA, 2001). Observa-se que a persistência da hipocalcemia nos pacientes com malária pode causar o hiperparatireoidismo secundário.

As medianas dos níveis séricos de FA e TGP/ALT foram, respectivamente, de 94,3 U/L e 19 U/L, e, portanto, dentro dos valores de referência. Entretanto, apresentaram valores significativamente mais elevados que o grupo controle (tabela 2). A correlação positiva (ainda que fraca) entre FA e as enzimas hepáticas (TGO/AST e TGP/ALT) justificam a elevação dos níveis séricos desses parâmetros bioquímicos quando comparados aqueles do grupo controle e reflete o comprometimento hepático observado

na malária, mesmo na ausência de complicações (BAHETI; LADDHA; GEHLOT, 2003; SIROMA et al. 2016; COSTA et al., 2017).

## 4. CONCLUSÃO

Neste estudo, observou-se 28,5% de hipovitaminose D em pacientes com malária, similar ao observado (24,6%) no grupo de indivíduos sem malária, em estudo realizado no município de Itaituba, Pará, Brasil.

Houve predominância da infecção pelo *P. vivax* (91,9%).

Níveis séricos de Ca e P foram significativamente inferiores nos indivíduos com malária em relação aqueles do grupo controle.

Níveis séricos de FA e TGP/ALT foram significativamente superiores nos indivíduos com malária em relação aqueles do grupo controle.

Os níveis reduzidos de 25(OH)D observados em 28,5% e de Ca presente em 8,1% dos pacientes com malária influenciaram significativamente no aumento do PTH.

O eixo cálcio-PTH-25(OH)D se manteve atuante nos pacientes com malária, evidenciado pela fraca, porém, significativa correlação negativa entre PTH e Ca e entre PTH e 25(OH)D.

A elevada parasitemia em pacientes com malária por *P. vivax* influenciou significativamente na redução dos níveis de fósforo sérico.

O aumento das enzimas hepáticas (TGO/AST, TGP/ALT) influenciaram significativamente na elevação dos níveis de FA.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil, pelo apoio técnico e logístico para realização desta pesquisa, e ao Dr. Paulo C. Azevedo pelo apoio técnico.

## 6. REFERÊNCIAS

- BAHETI, R.; LADDHA, P.; GEHLOT, R.S. Liver involvement in *falciparum* malária – A histopathological analysis. **J Indian Acad Clin Med**, v. 4, n. 1, p. 34-8, 2003.
- BIOMÉRIEUX SA. **VIDAS® 25 OH Vitamin D TOTAL (VITD)**. REF 40 463, 2015.
- BRANCE, M.L.; MILJEVIC, J.N.; TIZZIANI, R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in hospitalized adults with community-acquired pneumonia. **Clin Respir J**, v. 12, n. 7, p. 2220-2227. 2018.
- BRASIL, P.; ZALIS, M.G.; PINA-COSTA, A.; et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet**, v. 5, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. 2ª ed, Brasileira, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. v. 3, 1ª ed, Brasília, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. **Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária**. Brasileira, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. 1ª ed, Brasília, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. CGPNM/DEVIT/SVS/MS. **Boletim Malária região Amazônica**. **14/01/2020**. **2020** Disponível em: <[https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep\\_regioAmaznica\\_2019\\_10\\_31\\_15797230553370/casos\\_notificados\\_2019\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep_regioAmaznica_2019_10_31_15797230553370/casos_notificados_2019_regio_Amaznica)>, acesso em 24/02/2020.
- CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.55, n. 8, 2011.
- CATRAIO, I.T.F.F. et al. A determinação social da malária: um estudo de caso na epidemiologia hospitalar. **Revista Uniandrade**, v.12, n. 2, p.125-132, 2013.
- CONFALONIERI, U.E. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. **Estud Av**, v. 19, n. 53, p. 221-236, 2005.
- COSTA, R.A.G.; TARRAGÔ, A.M.; GARCIA, N.P.; PIMENTEL, J.P.D.; NEVES, W.L.L.; MELO, G.Z.S.; et al. Influência da infecção por *Plasmodium vivax* nos marcadores hematológicos e hepáticos em pacientes de um município da Região Amazônica brasileira. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 8, n. 2, p. 13-21, 2017.
- COUTO, R.D.A.; LATORRE, M.R.D.O.; S SANTI, S.M.D.; NATAL, D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.

CUSICK, S.E.; OPOKA, R.O.; LUND, T.C.; JOHN, C.C.; POLGREEN, L.E. Vitamin D insufficiency is common in Ugandan children and is associated with severe malaria. **Published online**, v.9, n.12, p.e113185, 2014.

DAVIS, T.M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; WOODHEAD, J.S.; HOLLOWAY, P.; CHAIVISUTH, B.; WHITE, N.J. Calcium and phosphate metabolism in acute falciparum malaria. **Clin Sci**, v.81, p. 297-304, 1991.

DAVIS, T.M.E.; LI, G-Q.; GUO, X-B.; SPENCER, J.; ST JOHN, A. Serum ionised calcium, serum and intracellular phosphate, and serum parathormone concentrations in acute malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, p. 49-53, 1993.

DAVIS, T.M.E.; SINGHB, B.; CHOOC, K.E.; IBRAHIMB, J.; SULAIMANB, S. A.; KADIRB, Z.A.; ISMAIL, R. Dynamic assessment of parathyroid function in acute malaria. **Journal of Internal Medicine**, v. 243, p. 349–354, 1998.

GRANT, F.K.; SUCHDEV, P.S.; FLORES-AYALA, R.; COLE, C.R.; RAMAKRISHNAN, U.; RUTH, L.J. Correcting for inflammation changes estimates of iron deficiency among rural Kenyan preschool children. **J Nutr**, v. 142, n. 1, p. 105-11, 2012.

HAAN K.; GROENEVELD, A.B.J.; GEUS, H.R.H.; EGAL, M, STRUIJS, A. Vitamin D deficiency as a risk factor for infection, sepsis and mortality in the critically ill: systematic review and meta-analysis. **Crit. Care**, v. 18, n. 6, p. 600, 2014.

HE, X.; YAN, J.; ZHU, X.; WANG, Q.; PANG, W.; QI, Z.; WANG, M.; LUO, E.; PARKER, D.M.; CANTORNA, M.T.; CUI, L.; CAO, Y. Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response. **J Immunol**, v.193, n. 3, p. 1314-23, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRA DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estimativa populacional 2017 IBGE**. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/itaituba/panorama>>, acesso em 30/08/2017.

KIM, J.H.; PARK, J.S.; CHO, Y.J.; YOON, H.I.; SONG, J.H.; LEE, C.T.; LEE, J.H. Low serum 25-hydroxyvitamin D level: an independent risk factor for tuberculosis? **Clin Nutr**, v. 33, n.6, p. 1081-1086, 2014.

LIM, J.H.; RAVIKUMAR, S.; WANG, Y.M. et al. Bimodal influence of vitamin D in host response to systemic Candida infection-vitamin D dose matters. **J Infect Dis**, v. 212, n. 4, p. 635-644, 2015.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA. INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (IEC). **Referência de exames laboratoriais**. Ananindeua, PA, 2018.

LACERDA, M.V.; MOURÃO, M.P.; ALEXANDRE, M.A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHAES, B.M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malar J**, v. 11, n. 12, 2012.

LIMA, A.E.O. **Caracterização epidemiológica do surto de malária na região do garimpo de Areinha, Alto Jequitinhonha, Minas Gerais**. (Dissertação). Mestrado Interdisciplinar em Saúde, Sociedade e Ambiente. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, Minas Gerais, 2019.

LIMA, J.G.; NÓBREGA, L.H.C.; NÓBREGA, M.L.C. **Aulas em Endocrinologia**. Editora Atheneu, p. 269-273, 2001.

LOPES, T.M.R.; VENTURA, A.M.R.S.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; GUIMARÃES, L.H.R. Situação epidemiológica da malária em uma região de Garimpo, na região da Amazônia brasileira, no período de 2011 a 2015. **REAS/EJCH**, v. 25, n. 759, 2019.

LUONG, K.V.; NGUYÊN, L.T. The role of vitamin D in malaria. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n.1, p. 8-19, 2015.

MACIEL, G.B.M.L; OLIVEIRA, E.C. Perfil entomológico e epidemiológico da malária em região garimpeira no norte do Mato Grosso, 2011. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 23, n 2, p. 355-360, 2014.

MAEDA, S.S.; BORBA, V.Z.C.; CAMARGO, M.B.R.; SILVA, D.M.W.; BORGES, J.L.C.; BANDEIRA, F.; et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 5, p. 411-433, 2014.

McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. Academic, 1992.

NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 12ª ed, Atheneu, 2011.

NOROUZINEJAD, F.; GHAFARI, F.; RAEISI, A.; NOROUZINEJAD, A. Epidemiological status of malaria in Iran, 2011–2014. **Asian Pac J Trop**, v. 9, n. 11, p. 1055-1061, 2016.

OLNEY, D.K.; KARIGER, P.K.; STOLTZFUS, R.J.; KHALFAN S.S.; TIELSCH, J.M. Developmental effects of micronutrient supplementation and malaria in Zanzibari children. **Early human development**, v. 89, n. 9, p. 667-74, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Organization World Health. **Malária**. Atualizado em 04/2016. Disponível em <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875)>, acesso em 04/12/2018.

OWUSU-AGYEI, S.; NEWTON, S.; MAHAMA, E.; FEBIR, L.G.; ALI, M.; ADJEI, K.; et al. Impact of vitamin A with zinc supplementation on malaria morbidity in Ghana. **Nutr J**, v. 12, p. 131, 2013.

PARISE, E.V.; ARAÚJO, G.C.; CASTRO, J.G.D. Aspectos epidemiológicos da malária no Estado do Tocantins, Brasil, e a origem dos casos – período de 2003 a 2008. **Rev Pat Trop**, v. 41, n. 4, p. 442-456, 2012.

PRABHA, M.R.; PEREIRA, P.; CHOWTA, N.; HEGDE, B.M. Clinical implicações da hipocalcemia na malária. **Indian J Med Res**, v. 108, p. 62-65, 1998.

REISEN, W.K. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. **Annu Rev Entomol**, v. 55, p. 461-483, 2010.

SAUTET, J.; VUILLET, J.; ARNAUD, G. Effects of the immediate adjunction of cod liver oil or vitamin D and calcium biphosphate to antimalarial drugs used in the treatment of *Plasmodium berghei* infections. II. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 50, n. 6, p. 44-49, 1957.

SERGACHEVA, I.; SOKHANENKOVA, T.L.; SOPRUNOV, F.F.; LUR'E, A.A. Effect of vitamins D and E on the development of *Plasmodium berghei* infection in mice. **Med Parazitol**, v. 5, n. 7, p. 15-18, 1986.

SIEMENS. ADVIA Centaur® XP. **Hormona paratiroideia (PTH) intacta**, 2018-04.

SIROMA, T.K.; FERRARI, E.C.; RIGO, R.S. *Plasmodium vivax*: causa de malária grave. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 14, n. 3, p. 166-71, 2016.

SBEM. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) – **Intervalos de Referência da Vitamina D - 25(OH)D**, 2017.

ST JOHN, A.; DAVIS, T.M.E.; BINH, T.Q.; THU, L.T.A.; DYER, J.; ANH, T.K. Mineral homeostasis in acute renal failure complicating severe falciparum malaria. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 8, p. 2761-2767, 1995.

TOKO, E.N.; SUMBA, O.P. Daud Maternal vitamin D status and adverse birth outcomes in children from rural western Kenya. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 719, 2016.

VAN SCHOOR, N.M.; LIPS, P. Worldwide vitamin D status. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 25, n. 4, p. 671–680. 2011.

VENTURA, A.M.R.S.; FERNANDES, A.A.M.; ZANINI, G.M.; PRATT-RICCIO, L.R.; SEQUEIRA, C.G.; DO MONTE, C.R.S.; et al. Clinical and immunological profiles of anemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará state, Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 181, p. 122-131, 2018.

WESSELLS, K.R.; HESS, S.Y.; OUEDRAOGO, Z.P.; ROUAMBA, N., OUEDRAOGO, J.B.; BROWN, K.H. Asymptomatic malaria infection affects the interpretation of biomarkers of iron and vitamin A status, even after adjusting for systemic inflammation, but does not affect plasma zinc concentrations among young children in Burkina Faso. **J Nutr**, v. 144, n. 12, p.2050-2058, 2014.

WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723-35, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Treatment of Malaria**. World Health Organization, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. Geneva: World Health Organization; 2018a Disponível em <<https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>>, acesso em 09/01/2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brasil e Venezuela respondem por mais da metade dos casos de malária nas Américas | ONU Brasil**. 2018b. Disponível em <<https://nacoesunidas.org/oms-brasil-e-venezuela-respondem-por-mais-da-metade-dos-casos-de-malaria-nas-americas/>>, acesso em 09/01/2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2019**. Geneva: World Health Organization; 2019. Disponível em <<https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>>, cesso em 24/02/2020.

YADAV, S.P.; KALUNDHA, R.K.; SHARMA, R.C. Sociocultural factors and malaria in the desert part of Rajasthan, India. **J. Vector Borne Dis**, v. 44, p. 205-212, 2007.

## COMUNICAÇÃO JUNCIONAL NO SISTEMA IMUNOLÓGICO: A EXPRESSÃO DAS JUNÇÕES COMUNICANTES NA INFECÇÃO COM *Trypanosoma cruzi*

**Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho<sup>1,2\*</sup>, Camila Moura da Silva<sup>2\*</sup>, Daniel Rodrigues Souza<sup>2,3</sup>, Thiago Manchester de Mello<sup>2</sup>, Regina Coeli dos Santos Goldenberg<sup>4</sup>, Sérgio Henrique Seabra<sup>5,6</sup>, Fabio da Silva de Azevedo Fortes<sup>2,6</sup>**

1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil;

2. Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular Professor Antonio Carlos Campos de Carvalho, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

3. Centro Universitário IBMR, Laboratório de Terapia e Fisiologia Celular e Molecular Prof. Antonio Carlos Campos de Carvalho, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

4. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

5. Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Laboratório de tecnologia em cultura de células e Laboratório de tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil;

6. UEZO, UNIGRANRIO & InMETRO, Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil.

\*. Igualdade de primeira autoria

### RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) calculam que oito milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo. Na infecção chagásica, o parasito é capaz de prejudicar o funcionamento das células hospedeiras através de mudanças na comunicação celular. No entanto, essas junções não estão totalmente caracterizadas em macrófagos. Seus mecanismos reguladores ainda merecem esclarecimentos, principalmente antes de mudanças patológicas, como nos processos infecciosos e inflamatórios causados por *T. cruzi*. Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a modulação estrutural e funcional das junções comunicantes, formadas pela Conexina 43 em linhagens macrofágicas J774-G8 infectado com o *T. cruzi* através de ensaios de: Imunoeletroforese (*Western Blot*) e Imunofluorescência. Os resultados mostraram que células de linhagem macrofágica J774-G8 apresentam alterações no perfil de comunicação intercelular por junções comunicantes. Em experimentos de *western blot* realizados em culturas infectadas com *T. cruzi* por 48h houve aumento significativo na comunicação juncional. Entretanto, os resultados de imunofluorescência em incubações de até 72h mostraram que a conexina 43 não estava presente na membrana e que, possivelmente, estaria retida no citoplasma, concluindo que a desorganização do citoesqueleto interfere no posicionamento da conexina 43 em células de linhagem macrofágicas infectadas com o *Tripanosoma cruzi*.

**Palavras-chave:** Conexina 43, Macrófagos e Doença de Chagas.

## ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The World Health Organization (WHO) reports estimate that eight million people are infected worldwide. In chagasic infection, the parasite is able to impair the functioning of host cells through changes in cellular communication. However, these junctions are not fully characterized in macrophages. Its regulatory mechanisms still deserve clarification, especially before pathological changes, such as in the infectious and inflammatory processes caused by *T. cruzi*. Thus, the main objective of this study was to evaluate the structural and functional modulation of the communicating junctions, formed by Connexin 43 in macrophage lines J774-G8 infected with *T. cruzi* through tests of: Immunoelectrophoresis (Western Blot) and Immunofluorescence. The results showed that cells of J774-G8 macrophage lineage present alterations in the profile of intercellular communication by communicating junctions. In western blot experiments carried out in cultures infected with *T. cruzi* for 48 h there was a significant increase in junctional communication. However, the results of immunofluorescence in incubations of up to 72 h showed that connexin 43 wasn't present in the membrane and, possibly, would be retained in the cytoplasm, concluding that the disorganization of the cytoskeleton interferes with the positioning of connexin 43 in macrophage cells infected with *T. cruzi*.

**Keywords:** Connexin 43, Macrophages and Chagas disease

## 1. INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas, uma doença negligenciada que acomete em torno de oito milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2020), principalmente nas Américas, causando cerca de 12.000 mortes por ano (WHO, 2015), tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que vive e se multiplica no interior das células de uma variedade de tecidos (DUMONTEIL; HERRERA, 2017). O parasito é transmitido, geralmente, por meio da contaminação da conjuntiva, das mucosas ou de lesões cutâneas através das fezes do hospedeiro invertebrado, espécies de hemípteros hematófagos pertencentes à família Reduviidae e subfamília Triatominae, comumente conhecidos como “barbeiros”, como *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) sendo os vetores mais comuns (NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Na infecção chagásica, diversos sistemas fisiológicos sofrem alterações e parte destas complicações está associada à alteração funcional das junções comunicantes que são canais transmembrana que permitem a comunicação direta nos tecidos (DHEIN, 1998). As junções comunicantes são formadas por uma família multigênica de proteínas transmembranares denominadas conexinas. Fazem parte da família destas proteínas 21 conexinas em humanos (SALAMEH; DHEIN, 2011). As conexinas compõem diversos

sistemas fisiológicos, porém estas junções não estão inteiramente caracterizadas em alguns sistemas. Dentre estes, podemos destacar o sistema imunológico e, particularmente, os macrófagos que participam do processo de resposta inata (BENNET et al., 2003; SAEZ et al., 2003).

A caracterização morfológica e funcional das junções comunicantes em macrófagos, em particular a conexina 43 – proteína presente neste sistema – tem sido alvo de estudo de diversos grupos, pois têm um papel-chave na homeostase dos tecidos, na inflamação e reparação (DE MAIO et al., 2002; CHANSON et al., 2005), bem como na hematopoiese (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2000). No entanto, seus mecanismos regulatórios ainda merecem esclarecimentos, principalmente diante de alterações patológicas, como nos processos infecto-inflamatórios causados pelo *T. cruzi*.

De acordo com diversos achados, ainda é possível inferir que as junções comunicantes tenham outros papéis potencialmente importantes na resposta imunológica, como por exemplo, o de "alertar" células vizinhas através de moléculas de sinalização, o que pode ajudar no recrutamento de componentes associados à resposta imunológica inata e adaptativa (HANDEL et al., 2007). Portanto, é importante entender os possíveis mecanismos que possam ser utilizados para que o processo infecto-inflamatório causado pelo protozoário *T. cruzi* seja melhor compreendido.

Desta forma, ao estudar a comunicação juncional em macrófagos, será possível não só compreender a função das junções comunicantes neste tipo de célula migratória, como também vislumbrar perspectivas para a modulação destas estruturas o que, conseqüentemente, contribuirá para o desenvolvimento de ferramentas que melhorem o desempenho destas células em pacientes chagásicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CÉLULAS DA LINHAGEM MACROFÁGICA J774-G8

A linhagem de células macrofágicas J774-G8 (UNKELESS et al., 1979), foi mantida em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (V/V) e 1% de penicilina e estreptomicina e cultivadas em estufa de CO<sub>2</sub> a

37°C, e o plaqueamento foi feito com uma densidade inicial de  $1 \times 10^6$  células/ml, em garrafas de plástico de 25 cm<sup>2</sup> e em lamínulas de vidro número 1.

## 2.2 MANUTENÇÃO DAS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*, cepa Y.

Formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram cultivadas em culturas de células LLCMK-2 mantidas em meio DMEM suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino por seis dias em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o 6º dia da infecção os parasitos foram coletados do sobrenadante e centrifugados a 2332 x g por 10 minutos (min). A interação parasito-célula foi feita em garrafas de plástico de 25cm<sup>2</sup> e em lamínulas de vidro número 1 com células de linhagem macrófaga J774-G8 em confluência, na proporção de cinco parasitos por célula (5:1) e avaliado nas janelas de 24h, 48h e 72h.

## 2.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS

As culturas de células J774-G8 controle e infectadas com *T. cruzi* em intervalos de 24h, 48h e 72h foram avaliadas quanto ao crescimento celular e a sua morfologia por meio de imagens obtidas no microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, ZEISS, Alemanha) no aumento de 400x. Nestes tempos o desprendimento das células e aspecto geral da monocamada foi monitorado. Foram selecionadas cinco imagens de cada grupo (controle e infectadas) e as células e grumos celulares foram contadas pelo cálculo da média e o desvio padrão das imagens.

## 2.4 IMUNOELETRORANSFERÊNCIA

A extração de proteína ocorreu pela retirada mecânica das células em solução de PBS 1% e bicarbonato de sódio 1 mM seguida da centrifugação a 428 x g durante 10 min. O material precipitado foi ressuspenso em solução Tween-20 1%, centrifugado a 428 x g durante 5 min e o precipitado foi ressuspendido e armazenado no coquetel de inibidores de proteases (Inibidores de protease: PMSF – 50 mM em etanol; Leupeptina – 5 mg/mL; EDTA - 200 mM; Aprotinina – 10 mg/mL; E-64 – 1 mM; Pepstatina – 1 mg/mL; Antipaina – 10 mM; 0-fenantrolina – 200 mM) e bicarbonato de sódio 1 mM). A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) e a separação das proteínas totais

ocorreu pela aplicação de 22,5 µg do material extraído em de gel de eletroforese desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Após a corrida eletroforética a transferência das proteínas para a nitrocelulose ocorreu no sistema semi-seco e a membrana foi incubado em tampão TBS, contendo leite em pó desnatado Molico<sup>R</sup> a 5%, e Tween 20 a 0.5% por 30 min, seguidapor 3 lavagens com TBS-T por 10 min e a incubação com anticorpo policlonal anti-Cx43 (ab11370) por 17 horas (h) seguido do anticorpo secundário anti-rabbit conjugado horseradish peroxidase para quimioluminescência, por 2 h. Após nova lavagem com TBS-T, a nitrocelulose foi incubada com a solução de ECL (Substrato de peroxidase para quimioluminescência) acrescentada a Peróxido por 10 min para revelação no sistema *ChemiDoc MP imaging system* BIO-RAD, e avaliado pelo programa Image lab 5.1.

## 2.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1h em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBS-TRITON X-100R 1% e incubadas com albumina sérica bovina diluída em PBS a 2% por 30 min. Após a incubação com os anticorpos as células foram lavadas com PBS 3 vezes, sendo usado o anticorpo policlonal anti-Cx43 (ab11370) e o anticorpo secundário ALEXA 488 (A-11008), o marcador de citoesqueleto Faloidina (F-actina) 546 (A22283) e o marcador nuclear DAPI (*4',6 diamidino-2-phenylindole*). Em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas com Prolong gold<sup>R</sup> (Invitrogen), para diminuição do tempo de decaimento da fluorescência. As lâminas foram observadas no microscópio confocal LSM 710 QUASAR (Carl ZEISS, Oberkochen, Alemanha).

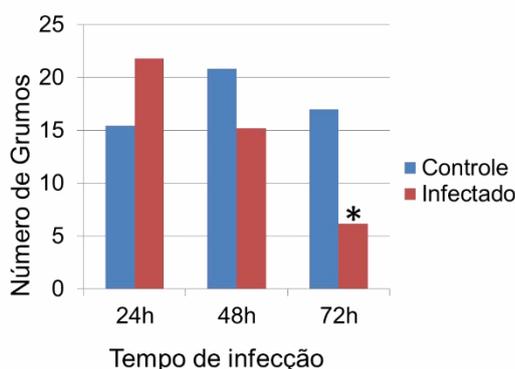
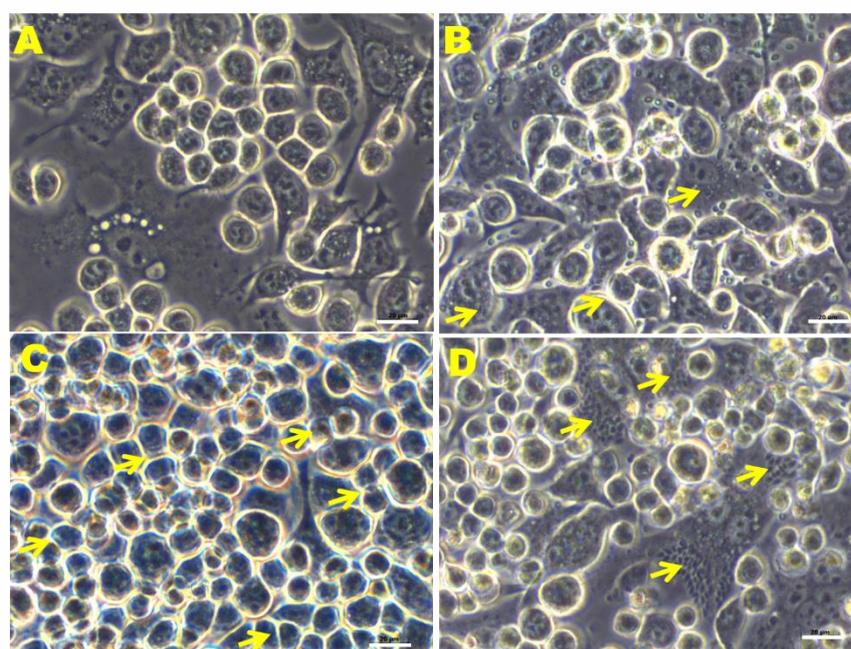
## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi plotada no programa *GraphPad Prism 6*. Os testes Qui-quadrado e One Way Anova foram utilizados para a análise inferencial em um nível de significância inferior a 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 INFEÇÃO COM O *T. cruzi*: CRESCIMENTO CELULAR E ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Foi avaliado o comportamento da cultura celular através de microscopia de contraste de fase (Figura 1) a fim de identificar o comportamento celular quanto ao crescimento, uma vez que infectada as células possuem mecanismos de resposta para combater a parasitemia.



**Figura 1.** Micrografias em microscopia óptica (contraste de fase) utilizando células da Linhagem Macrofágica J774-G8 controle (A) e infectadas com *T. cruzi* em 24h (B), 48h (C) e 72h (D) na proporção de cinco parasitos por célula.

Alterações morfológicas nas células J774-G8 são evidentes, como pode ser observado nas fotos B, C e D (seta dando destaque). Com o aumento do tempo de infecção a quantidade de parasitos aumentou o que pode explicar o dano celular e a morte de células. Barra de calibração 20µm. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X). Gráfico comparativo do número de grumos celulares nas culturas da Linhagem Celular Macrofágica

J774-G8 controle e após infecção com *T. cruzi*, em períodos de 24, 48 e 72 horas. Foi possível observar grumos celulares com um menor número de células em 72 horas de incubação com *T. cruzi*, essa redução ocorre pela diminuição do acoplamento celular juntamente com o aumento na parasitemia e a redução do crescimento e sobrevivência celular. Desvio Padrão: 5,562. Estatisticamente  $P < 0,05$  por *T* de *student*. Total de experimentos: 2.

Sabe-se que os macrófagos infectados por *T. cruzi* produzem IL-12, responsável pela síntese inicial de IFN- $\gamma$  pelas células N; o IFN- $\gamma$  tem um papel importante na ativação de macrófagos, produzindo altos níveis de óxido nítrico (NO) que controlam a replicação do parasito na fase aguda da infecção (CARDILLO et al., 1996; SARDINHA et al., 2006), embora o mecanismo de ação pelo qual o NO realiza seu efeito citotóxico contra o *T. cruzi* não está completamente esclarecido. O aumento na morte celular pode ser atribuído, também, a quantidades excessivas de NO (ARANTES et al., 2004), que possui um efeito prejudicial à célula devido à sua atividade pró-inflamatória durante a fase aguda de infecção, levando a morte celular e danificando tecidos e órgãos durante a fase aguda (RIBEIRO et al., 2007). Além disso, o aumento da parasitemia também é reforçado pelos diversos mecanismos de evasão, como a liberação de enzimas antioxidantes liberadas após a fusão dos lisossomos ao vacúolo parasitóforo e peroxidases e superóxido dismutases que o protegem das espécies reativas de oxigênio (ROS) (PIACENZA et al., 2008).

A forma tripomastigota também altera o influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular induzido por fatores solúveis secretados pelo parasito, induzindo a liberação do cálcio armazenado no retículo endoplasmático através da via IP<sub>3</sub>, o que ocasiona a despolimerização de filamentos de actina e facilita a migração de lisossomos necessária para a invasão da célula pelo parasito (VIEIRA et al., 2002; ADESSE et al., 2010). O  $Ca^{2+}$  também atua na ativação de diversas enzimas que promovem a inativação do ATP (ATPases) (TURI e TÖRÖK, 1985) lise das membranas celulares (fosfolipases), lise das proteínas estruturais e das membranas (proteases), bem como a fragmentação da cromatina (endonucleases) (BERKE, 1989; MCCONKEY et al., 1990).

Com isso, foi observado na figura 1 o gráfico comparativo gerado a partir da análise do número de grumos observados durante a infecção com *T. cruzi* nos períodos de 24h (Figura 1B), 48h (Figura 1C) e 72h (Figura 1D). Observou-se que a maior quantidade de grumos em cultura esteve presente no tempo de 24h após a infecção com o parasito, e os grumos celulares diminuíram significativamente após 72h.

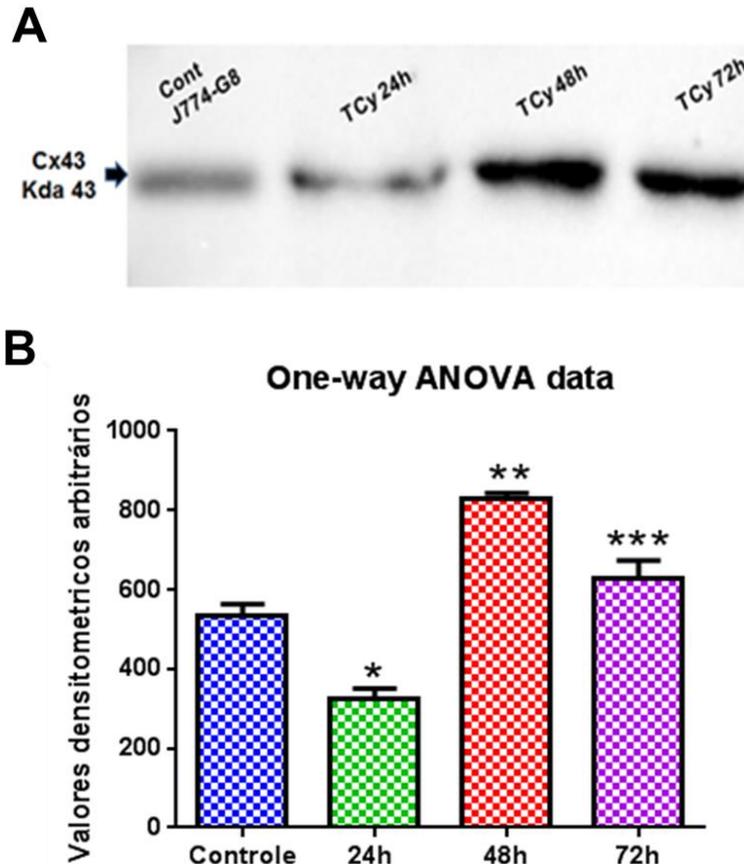
Com base nos resultados obtidos, observou-se que houve alterações em todos os tempos de incubação, com o desprendimento das células da garrafa de cultivo, levando a diminuição do número de células em cultura e o aumento na quantidade de parasitos livres pela lise celular, destacando que o maior dano ocorreu em 72 h de interação.

### 3.2 INFECÇÃO COM O *T. cruzi*: EXPRESSÃO DA CONEXINA 43

Na infecção chagásica, o parasito é capaz de prejudicar o funcionamento das células hospedeiras através de alterações na comunicação celular (DE CARVALHO et al., 1992). Porém, estas junções não estão inteiramente caracterizadas no sistema imunológico e, em particular, nos macrófagos que participam da resposta inata (FORTES et al., 2004). Diante desta situação, diversos estudos têm sido realizados a fim de se conseguir responder às ações do *T. cruzi*, bem como entender os possíveis mecanismos envolvidos na potencialização e/ou no controle da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi* (CARDILLO et al., 2015).

Com isso, a expressão dos níveis proteicos da conexina 43 foi analisada por meio de ensaios de imunoeletrortransferência, utilizando células J774-G8 controle e infectadas nos tempos de 24, 48 e 72 h. As análises demonstraram que a Cx43 foi expressa não só nas células controle, como também naquelas infectadas em todos os tempos de interação, como destacado na figura 2. A banda representando a interação com o parasito em um período de incubação de 24 h apresentou uma menor expressão de Cx43 do que nas células controle. Porém, a banda que representa 48 h de infecção, revelou uma maior expressão da Cx43 em relação às células controle e a infecção de 24h, seguida da menor expressão de Cx43 em 72h, mas com a expressão maior em relação às células controle e 24h de infecção. Os dados densitométricos confirmaram os achados visíveis representados na membrana marcada com o anticorpo para Conexina 43 (Figura 2A).

Os processos infecto-inflamatórios desencadeiam a produção de diversas citocinas e interleucinas que são capazes de ativar as células do sistema imunológico, em particular os macrófagos (DE MAIO et al., 2002; CHANSON et al., 2005). Esse processo de ativação pode gerar o aumento nos níveis comunicação entre as células, principalmente caso as informações necessitem ser passadas a diante, como ocorre na apresentação de antígenos para as células responsáveis pela memória imunológica (ABBAS et al., 2011). Esta comunicação pode, também, ocorrer por junções comunicantes, de acordo com os achados de Fortes et al. (2004).



**Figura 2.** Experimentos de Western Blot de linhagem de células macrofágicas J774-G8 controle (não-infectada) ou infectada (período de 24, 48 e 72 horas, respectivamente). A marcação em 43 kDa para Cx43. Quantidades iguais de proteína foram carregadas no gel. Nota-se uma diminuição da expressão da Cx43 em relação ao controle (Cont.), nas células J774-G8 infectadas em 24 horas (TCy 24h), no entanto é possível notar um aumento da expressão de Cx43 em 48 horas (TCy 48h) se comparado ao horário de 24 horas. Em 72 horas (TCy 72h), novamente, há uma diminuição da expressão de Cx43 se comparado a 48 horas. Porém, ainda maior em relação ao controle e 24h horas de infecção. Gráfico densitométrico das bandas de *Western blot* de culturas das células J774-G8 controle e infectadas nos tempos de 24 e 48 e 72 horas. Nota-se uma diminuição da expressão da Cx43 em 24 horas de infecção e um aumento significativo desta proteína em 48 horas em relação ao controle. Em 72 horas há uma diminuição da expressão de Cx43 se comparado a 48 horas. Porém, ainda maior em relação ao controle e 24h horas de infecção.  $p < 0,0001$  *One Way Anova*. A barra indica o desvio padrão. Total de experimentos: 2.

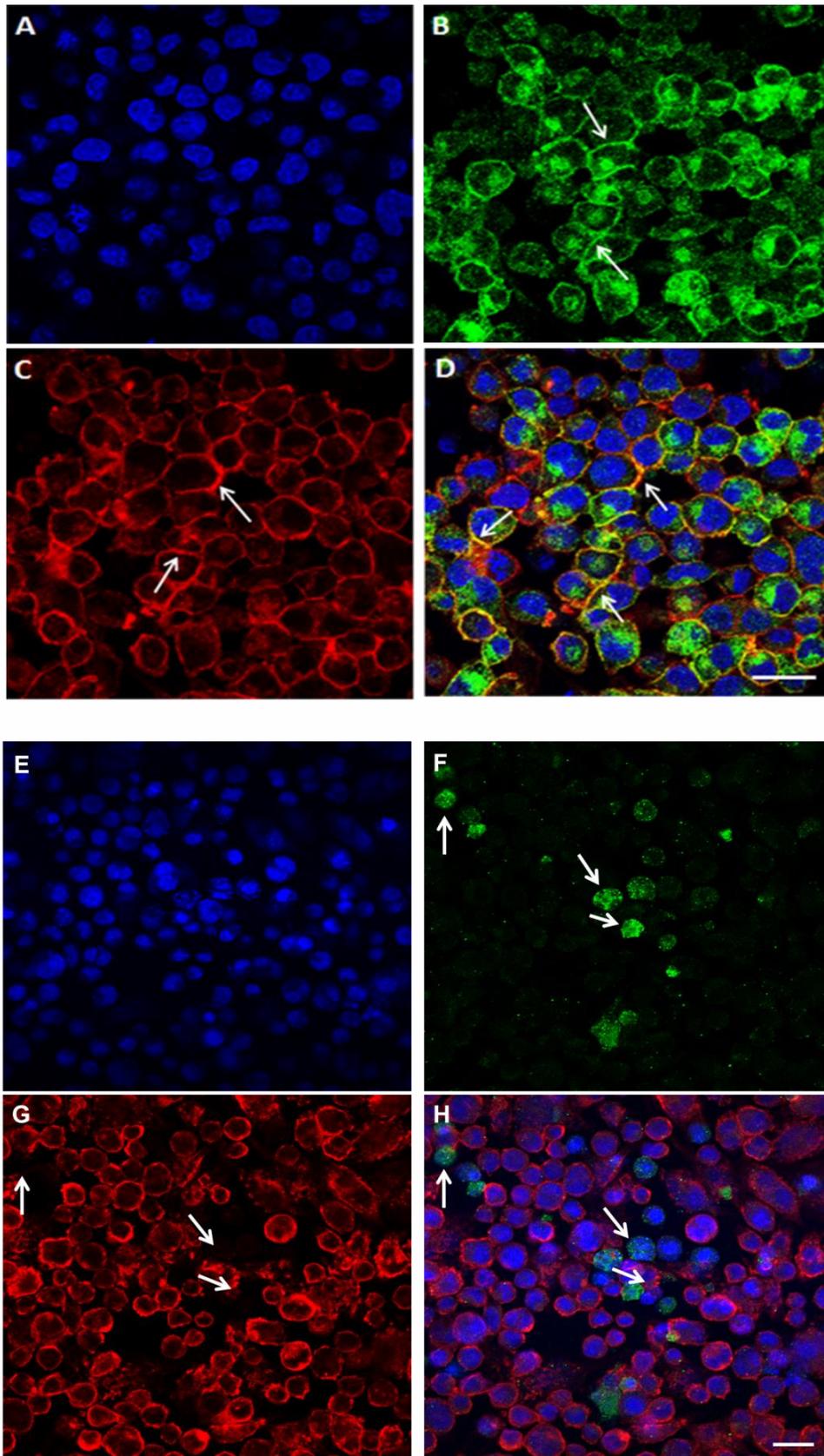
Desta forma, é possível inferir através dos dados achados nos experimentos imunoeletroforéticos (*Western blot*) que ocorre uma sinalização para que o macrófago tente melhorar o seu perfil de comunicação celular, elevando a produção de Cx43, o que poderia permitir a formação de junções comunicantes eficazes no processo de infecção aguda. No entanto, é possível que, em 48 h de infecção, não ocorra mais o acoplamento funcional através das junções comunicantes formadas pela Cx43 em macrófagos, uma vez que as alterações no citoesqueleto, ligadas a despolimerização da F-actina, já se tornam evidentes.

### 3.3 INFECÇÃO COM *T. cruzi*: LOCALIZAÇÃO DA CONEXINA 43 E INTERAÇÃO COM O CITOESQUELETO

A fim de avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* é capaz de alterar a organização espacial da proteína Cx43 nas células J774-G8, realizou-se experimentos de imunofluorescência com o anticorpo anti-conexina 43 (verde) para analisar se a Cx43 esta sendo expressa na membrana plasmática das células e se estaria sendo expressa da mesma forma após infecção com o *T. cruzi*. Além disso, utilizou-se o anticorpo anti-F-actina conjugado a Faloidina (vermelho) para verificar a organização do citoesqueleto das células e o DAPI (azul) para destacar o núcleo das células (Figura 3).

Ao analisar o experimento no sistema de microscopia confocal LSM710 Quasar, observou-se para o controle que a localização da Cx43 nas células J774-G8 se encontra essencialmente na membrana plasmática (Figura 3B). Já a aplicação do anticorpo F-actina conjugado a Faloidina demonstrou que os filamentos de actina estão distribuídos de forma uniforme pelas células J774-G8, podendo servir de ancoramento para outras proteínas (Figura 3C). A análise das imagens sobrepostas (Figura 3D) demonstra a colocalização entre as duas proteínas (Cx43 e marcação com Faloidina) em que os pontos amarelos que são resultantes da interação colorimétrica do verde e do vermelho dos dois anticorpos (Figura 3D, setas) indicam que o citoesqueleto interage com proteínas que desempenham as mais diversas funções na membrana plasmática. Com isso, pode-se observar a organização do citoesqueleto e a manutenção do arcabouço da membrana plasmática das células J774-G8, uma vez que a infecção com os parasitos pode alterar a organização celular e reduzir o posicionamento da Cx43, visto que os hemicanais juncionais (conexons) são transportados do complexo de Golgi até a membrana plasmática, através de microtúbulos, e precisam desta estrutura para que possam ser inseridos na membrana plasmática (MUSIL; GOODENOUGH, 1993; DHEIN, 1998, GAIETTA et al., 2002; SEGRETAIN; FALK, 2004).

Com isto, na sobreposição apresentada na Figura 3H observa-se que as células infectadas possuem a marcação para Cx43 prioritariamente no citoplasma celular, e não apresentaram marcação para faloidina, indicando que a desorganização no citoesqueleto poderia estar impedindo as células de se comunicarem, uma vez que a proteína Cx43 fica confinada no citosol e não consegue ser inserida na membrana da célula.



**Figura 3.** Imunofluorescência das células macrofágicas J774-G8 controle (A, B, C e D) e infectado com *T. cruzi* (E, F, G e H), analisada em Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Germany), evidenciam a marcação para proteína Connexina43 (verde), Faloidina (vermelho) e material genético nuclear (azul) em células de linhagem macrofágica J774-G8.

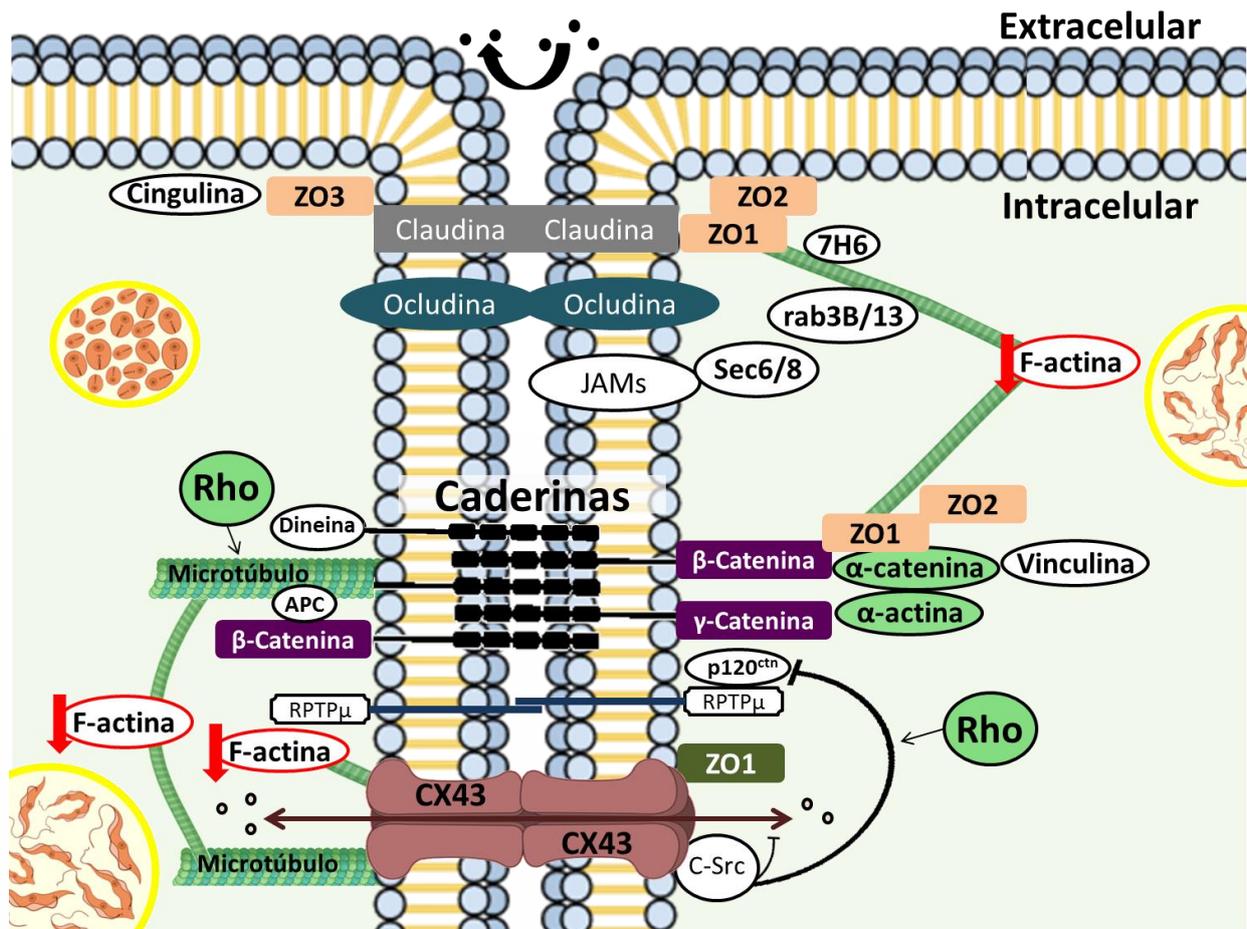
Em A podemos observar o núcleo das células marcadas com o DAPI, em B é demonstrado a marcação específica para Cx43 e em C a marcação do citoesqueleto pela Faloidina que pode ser observada na membrana plasmática das células controle. Na micrografia D é demonstrada a sobreposição das imagens, indicando uma possível colocalização entre as proteínas Cx43 e Actina (setas, pontos destacados em amarelo). Barra de calibração: 50 $\mu$ m. Em F, G e H as setas indicam que há infecção com *T. cruzi*. A porção F indica a marcação para Cx43 no citoplasma da célula e em G a marcação da F-actina desorganizada na células J774-G8. Em H não há colocalização entre Cx43 e F-actina como demonstrado no controle, destacando que as células que possuem marcação para Cx43 no citoplasma não possuem marcação para F-actina. Barra de calibração: 50 $\mu$ m

Sabe-se também que durante a invasão de tripomastigotas nas células hospedeiras os filamentos de actina formam uma barreira, com isso, a despolimerização da actina estimularia a invasão celular do parasito (VIEIRA et al., 2002; NAGAJYOTHI et al., 2008).

GIEPMANS (2004) propôs um modelo de organização estrutural e molecular das junções celulares envolvidas com adesão e comunicação celular, esta última por intermédio de junções comunicantes formadas particularmente pela Cx43. Dentre as proteínas envolvidas neste esquema merecem destaque a  $\alpha$ -catenina e  $\alpha$ -actinina, estando estas envolvidas com a formação do citoesqueleto e inserção da conexina na membrana plasmática.

De acordo com Giepmans (2004), a proteína  $\alpha$ -catenina está presente no complexo de proteínas que estão associadas com a proteína de adesão E-caderina, colocalizada e coimunoprecipitada com a Cx43. Segundo Fujimoto et al. (1997), as  $\alpha$ -cateninas estariam colocalizadas com a Cx43 no início da formação da placa juncional na membrana plasmática, sendo essenciais para o endereçamento e inserção da conexina na membrana, como foi observado em ensaios de microscopia confocal.

Associado a estes achados, nosso modelo propõe a interação direta da Cx43 com a F-actina, dado que na infecção com o parasito *T. cruzi* há a desorganização do citoesqueleto, bem como a alteração da expressão e inserção da Cx43 na membrana plasmática. Esta possível interação é proposta no esquema da figura 4.



**Figura 4.** Esquema propondo possíveis alterações na expressão do citoesqueleto, bem como na expressão e inserção da Cx43 na membrana plasmática de células infectadas com *T.cruzi*.

## 4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que as células da linhagem macrófaga J774-G8 infectadas com o parasito *T. cruzi* apresentaram não só alterações no crescimento celular, como também alteração na expressão proteica de Cx43, e a consequente deficiência em sua inserção na membrana plasmática. A análise por *western blot* mostrou o aumento da expressão da Cx43 em células de linhagem macrófaga J774-G8 infectadas com o *T. cruzi*, tendo o pico em 48 h, quando comparadas com as células não infectadas. Inicialmente inferimos que esta resposta poderia ter se dado como possível mecanismo de resposta celular a infecção com o parasito, exigindo maior comunicação intercelular.

Entretanto, apesar do aumento da expressão de Cx43 em relação às células não infectadas, os resultados de microscopia confocal demonstraram a sensível redução na expressão da Cx43 na membrana plasmática das células, coincidindo como a redução da marcação de F-actina das células infectadas por 72 h, deixando de apresentar a colocalização destas proteínas na membrana plasmática. Assim, apesar de expressão proteica aumentada na célula infectada, a presença do parasito altera a organização do citoesqueleto celular, interferindo no posicionamento da Cx43 na membrana da célula hospedeira.

Desta forma, poderíamos propor, inicialmente, que a infecção com o parasito diminui a capacidade de comunicação intercelular, alterando conseqüentemente a capacidade de resposta imunológica celular associada com macrófagos, que representam uma das primeiras linhas de defesa tecidual em seu papel fagocítico e na apresentação de antígenos.

## 5. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Prof<sup>a</sup>. Marlene Benchimol (Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer– IBCCF - UFRJ) por sua valiosa contribuição na revisão da dissertação de mestrado que deu origem a parte dos dados que compõem este capítulo, bem como a cessão de parte dos parasitas que foram utilizados na realização de experimentos. Agradecendo também ao apoio técnico oferecido pela Raquel do Nascimento de Souza no Departamento de Ciências Fisiológicas UFRRJ, ao website de imagens científicas Mind the Graph<sup>®</sup> e, por fim, ao suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 5. REFERÊNCIA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**., 7<sup>a</sup>Ed. Elsevier, 2011.

ADESSE, D.; IACOBAS, D.A.; IACOBAS, S.; GARZONI, L.R.; DE NAZARETH MEIRELLES, M.; et al. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 5, p. 846-854, 2010.

ARANTES, R.M.E.; MARCHE, H.H.; BAHIA, M.T.; CUNHA, F.Q.; ROSSI, M.A.; SILVA, J. S. Interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 4, p. 1361-1368, 2004.

BENNETT, M.V.; CONTRERAS, J.E.; BUKAUSKAS, F.F.; SÁEZ, J. C. New roles for astrocytes: gap junction hemi channels have something to communicate. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 11, p. 610-617, 2003.

BERKE, G. The cytolytic T lymphocyte and its mode of action. **Immunology letters**, v. 20, n. 3, p. 169-178, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARDILLO, F.; DE PINHO, R.T.; ANTAS, P.R.Z.; MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082, 2015.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 1, p. 128-134, 1996.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHANSON, M.; DEROUETTE, J.P.; ROTH, I.; FOGLIA, B.; SCERRI, I.; DUDEZ, T.; KWAK, B.R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1711, n. 2, p. 197-207, 2005.

DE CARVALHO, A.C.; TANOWITZ, H.B.; WITTNER, M.; DERMETZEL, R.; ROY, C.; HERTZBERG, E.L.; SPRAY, D.C. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. **Circulation research**, v. 70, n. 4, p. 733-742, 1992.

DE MAIO, A.; VEGA, V. L.; CONTRERAS, J. E. Gap junctions, homeostasis, and injury. **Journal of cellular physiology**, v. 191, n. 3, p. 269-282, 2002.

DHEIN, S. Gap junction channels and cellular communication. Recent discoveries of importance in medicine. **Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 123, n. 30, p. 912, 1998.

DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n.4, p.e0005422, 2017.

FORTES, F.S.A.; PECORA, I.L.; PERSECHINI, P.M.; HURTADO, S.; COSTA, V.; COUTINHO-SILVA, R.; et al. Modulation of intercellular communication in macrophages:

possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 20, p. 4717-4726, 2004.

FUJIMOTO, J.; SAWAMOTO, K.; OKABE, M.; OKANO, H.; YAMAMOTO, T. Molecular cloning and characterization of focal adhesion kinase of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology Of The Cell**. 8120 WOODMONT AVE, STE 750, BETHESDA, MD 20814-2755 USA: Amer Soc Cell Biology p. 2324-2324, 1997.

GAIETTA, G.; DEERINCK, T.J.; ADAMS, S.R.; BOUWER, J.; TOUR, O.; LAIRD, D. W.; et al. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 503-507, 2002.

GIEPMANS, B.N.G. Gap junctions and connexin-interacting proteins. **Cardiovascular research**, v. 62, n. 2, p. 233-245, 2004.

HANDEL, A.; YATES, A.; PILYUGIN, S.S.; ANTIA, R. Gap junction-mediated antigen transport in immune responses. **Trends in immunology**, v. 28, n. 11, p. 463-466, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MCCONKEY, D.J.; CHOW, S.C.; ORRENIUS, S.; JONDAL, M. NK cell-induced cytotoxicity is dependent on a Ca<sup>2+</sup> increase in the target. **The FASEB journal**, v. 4, n. 9, p. 2661-2664, 1990.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 917-924, 2000.

MUSIL, L.S.; GOODENOUGH, D.A. Multi subunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 1065-1077, 1993.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M.S.; THIRUVUR, N.; WEISS, L.M.; BRAUNSTEIN, V.L.; ALBANESE, C.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 1992-1997, 2008.

NORMAN, F.F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease and breast-feeding. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 10, p. 1561, 2013.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v. 410, n. 2, p. 359-368, 2008.

RIBEIRO, D.A.; CALVI, S.A.; PICKA, M.M.; PERSI, E.; DE CARVALHO, T.B.; CAETANO, P.K.; et al. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 3, p. 296-301, 2007.

SAEZ, J. C.; BRANES, M.C.; CORVALAN, L.A.; EUGENIN, E.A.; GONZALEZ, H.; MARTINEZ, A.D.; PALISSON, F. Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 4, p. 447-455, 2000.

SALAMEH, A.; DHEIN, S. Adrenergic control of cardiac gap junction function and expression. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 383, n. 4, p. 331-346, 2011.

SARDINHA, L.R.; ELIAS, R.M.; MOSCA, T.; BASTOS, K.R.; MARINHO, C.R.; LIMA, M.R.D.I.; et al. Contribution of NK, NK T,  $\gamma\delta$  T, and  $\alpha\beta$  T cells to the gamma interferon response required for liver protection against Trypanosomacruzi. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2031-2042, 2006.

SEGRETAIN, D.; FALK, M.M. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1, p. 3-21, 2004.

TURI, Á.; TÖRÖK, K. Myometrial (Na<sup>++</sup> K<sup>+</sup>)-activated ATPase and its Ca<sup>2+</sup> sensitivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 818, n. 2, p. 123-131, 1985.

UNKELESS, J.C.; KAPLAN, G.; PLUTNER, H.; COHN, Z.A. Fc-receptor variants of a mouse macrophage cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 3, p. 1400-1404, 1979.

VIEIRA, M.; DUTRA, J.M.; DE CARVALHO, T.M.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by Trypanosomacruzi. **Histochemistry and cell biology**, v. 118, n. 6, p. 491-500, 2002.

VIEIRA, M.; DUTRA, J.M.; DE CARVALHO, T.M.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochemistry and cell biology**, v. 118, n. 6, p. 491-500, 2002.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www9.who.int/chagas/en/>> Acesso em 04/05/2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

## TRANSMISSÃO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS: REVISÃO DA COBERTURA DO JORNALISMO DIGITAL ENTRE 2009 A 2019

**Daniela da Silva Paixão<sup>1</sup>, Luís Marcelo Aranha Camargo<sup>1,2,3,4,5</sup>, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti<sup>1,6</sup>**

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil;
2. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas 5, Monte Negro, RO, Brasil;
3. Centro Universitário São Lucas, Departamento de Medicina, Porto Velho, RO, Brasil;
4. Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, Porto Velho, RO, Brasil;
5. Instituto Nacional de Epidemiologia da Amazônia Ocidental, Porto Velho, RO, Brasil;
6. Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil.

### RESUMO

A Tripanossomíase Americana (TA) ou a Doença de Chagas (DC) até os dias atuais é considerada uma das doenças de mais larga distribuição no continente americano, sendo a transmissão pela via oral é hoje a forma mais importante. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão dos casos de doença de Chagas aguda por transmissão via oral, disponíveis na cobertura do jornalismo digital na Amazônia Legal, na região do Brasil onde há mais relatos de surtos no período de junho de 2009 a junho de 2019. A coleta de dados foi realizada em duas etapas: a primeira consistiu na pesquisa no Google onde foram encontradas 96 reportagens, após o processo de triagem e identificação dos artigos selecionaram-se 36 reportagens; na segunda etapa, procedeu-se à releitura na íntegra das reportagens resultando a amostra de 27 notícias. As 27 notícias encontradas relatam 19 ocorrências diferentes da DC oral, distribuídas entre os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins. O estado com maior número de casos relatados por jornais neste estudo foi o Pará, o principal alimento contaminado envolvido nos surtos foi o açaí produzido artesanalmente. Os envolvidos alegaram não ter conhecimento que o triatomíneo albergava o agente etiológico e que esse causava a DC. Dessa forma é necessário que a informação seja amplamente divulgada que assim como os jornais chegam ao dia a dia de todas as pessoas, que o conhecimento científico também seja aliado do saber popular.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Tripanossomíase e *Trypanosoma cruzi*.

### ABSTRACT

American trypanosomiasis or Chagas' disease (CD) is still considered one of the most widespread diseases in the American continent, oral transmission is now the most important form. The present study aimed to conduct a review of cases of acute Chagas disease by oral transmission, available in the coverage of digital journalism in the Legal Amazon, in the

region of Brazil where there are more reports of outbreaks from June 2009 to June 2019. Data collection was carried out in two stages: the first consisted of a Google search where 96 reports were found, after the screening and identification process of the articles, 36 reports were selected; in the second stage, the articles were re-read in full, resulting in a sample of 27 news items. The 27 news items found report 19 different occurrences of oral CD, distributed among the states of Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão and Tocantins. The state with the highest number of cases reported by newspapers in this study was Pará, the main contaminated food involved in the outbreaks was artisanal açaí. Those involved claimed to be unaware that the triatomine was home to the etiologic agent and that it caused CD, so it is necessary that the information be widely disseminated that just like the newspapers reach everyone's daily life, that scientific knowledge also be an ally of popular knowledge.

**Keywords:** Chagas disease, Trypanosomiasis and *Trypanosoma cruzi*.

## 1. INTRODUÇÃO

A Tripanossomíase Americana (TA) ou Doença de Chagas (DC) foi descoberta em 1909, durante uma expedição ao município brasileiro de Lassance, no interior do Estado de Minas Gerais, pelo médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas. Atualmente é considerada uma das doenças de mais larga distribuição no continente americano (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

A DC tem uma estimativa de 8 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo e mais de 10 mil mortes por ano afetando principalmente países da América Central e do Sul, região considerada endêmica para a enfermidade (OMS, 2019). Esse padrão vem sofrendo algumas alterações nos últimos anos, pois devido a emigração (principalmente de latino-americanos), estão tendo registros em países não-endêmicos, como o Canadá, Estados Unidos, países europeus e alguns países da Ásia (FIDALDO et al., 2018; GARCIA et al., 2015; MÉNDEZ et al., 2015; SCHMUNIS, 2007). Esses casos estão propiciando fechar o ciclo da enfermidade também nesses países, que já tinham a presença do vetor triatomíneo, porém sem a ocorrência do agente etiológico, expandindo assim a sua distribuição geográfica (MIRANDA-SCHAEUBINGER, et al., 2019). Na América Latina, os países com maior prevalência de casos de DC são a Argentina, México, Bolívia e Brasil (COURA, BORGES-PEREIRA, 2010; ARNAL et al., 2019).

No Brasil, estima-se que foram confirmados em torno de três mil casos da DC aguda nos últimos treze anos, representando uma média anual de mais de 200 casos, onde grande maioria dos infectados são do sexo masculino e tem em média 32 anos de idade (BRASIL, 2020). Entre 2012 a 2016 foram confirmados mais de 1.100 casos da DC aguda,

com uma taxa de incidência média anual de 0,1 casos/100 mil habitantes. Em 2018, houve confirmação de pouco menos de 400 casos (BRASIL, 2019; FIGUEIRA et al., 2019). No ano seguinte, a Amazônia Legal Brasileira apresentou em torno de 300 casos, aproximadamente 90% dos casos totais do Brasil, distribuídos entre os estados do Acre (5%), Amapá (7%), Amazonas (24%), Mato Grosso (0,6%), Maranhão (0,6%), Pará (74%), Rondônia (0,3%), Roraima (0,3%) e Tocantins (2%), o estado do Pará é o mais afetado (BRASIL, 2020).

O agente etiológico da DC é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, a qual pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae (LIMA; ARAUJO, 2019). O ciclo biológico da DC é heteróximo precisando de dois hospedeiros para completar seu ciclo (LIMA; ARAUJO, 2019).

No hospedeiro vertebrado se inicia quando as formas tripomastígotas metacíclicas, eliminados nas fezes e/ou urina dos vetores, penetram na pele através do local da picada ou em membranas mucosas, posteriormente transformam-se em amastigotas que sofrem divisão binária e em seguida diferenciam-se em tripomastígotas sanguíneos, que provocam a ruptura da célula parasitada, migrando em seguida para a corrente circulatória, chegando a atingir alguns órgãos que podem variar de acordo com as características genéticas do parasita que se divide em seis genótipos, denominados Unidades Discretas de Tipagem (DTU, do inglês Discrete Typing Units) (FIDALDO et al., 2018; ORTIZ et al., 2019). Nesse estágio, o *T. cruzi* pode ser ingerido por triatomíneos onde cumprirão seu ciclo extracelular (TYLER; ENGMAN, 2001).

No hospedeiro invertebrado o ciclo inicia-se durante a hematofagia, quando o vetor ingere a formas tripomastígotas sanguíneas. Após passar pelo intestino anterior do inseto, segue para o intestino médio, onde diferenciam-se em esferomastigota, e no intestino posterior em epimastigota (SANTOS et al., 2019). A forma epimastigota se multiplica por divisão binária simples longitudinal e em seguida diferencia-se em forma tripomastigota metacíclica na ampola retal do triatomíneo, estando presentes nas fezes e apto a penetrar em células do hospedeiro vertebrado completando assim o ciclo (TYLER; ENGMAN, 2001).

A DC apresenta duas maneiras de manifestar sua sintomatologia, a primeira pela fase aguda da doença que pode revelar sintomas ou não, e uma fase crônica, que pode se discernir nas formas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista (NUNES, 2018). A fase aguda da transmissão oral tem apresentado casos mais graves, ressaltando-se as alterações cardíacas, como a miocardite difusa com alterações nos resultados do

eletrocardiograma (ECG) (ORTIZ et al., 2019). Outras manifestações clínicas relatadas são: febre, dispneia, cefaleia, rash cutâneo, edema, adenomegalia, esplenomegalia, mialgia, vômito, epigastria, dor ocular, colúria, hepatomegalia, tosse, diarreia, taquicardia, icterícia, sinais hemorrágicos e prostração (CAVALCANTI et al., 2009).

Atualmente a transmissão pela via oral é a forma mais importante, são recorrentes os casos de DC por meio de contaminações de alimentos e bebidas com o *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2018). Exemplo disso são o açaí (*Euterpe oleracea*), o patoá (*Oenocarpus bataua*), a bacaba (*Oenocarpus bacaba*) e o caldo de cana, este último esteve envolvido em um surto da DC em Santa Catarina com o desfecho de três óbitos (PEREIRA et al., 2008). Outras formas de transmissão são através da transfusão de sangue, transmissão transplacentária, acidentes em laboratórios, manipulação de animais e transplantes de órgãos (FIDALDO et al., 2018).

A profilaxia da transmissão oral é realizada por meio de cuidados com a higiene mantendo as boas práticas em todo o processo desde a colheita até o produto final da produção de alimentos *in natura*. Além disso, os órgãos responsáveis devem realizar a fiscalização e liberar os produtos apenas se as normas técnicas tenham sido seguidas fielmente (SANTANA et al., 2019).

Não se encontra na literatura um estudo sobre as principais matérias de jornais e revistas com foco na Amazônia, embora ao longo dos anos há substancial aumento de casos agudos da DC, principalmente por meio da contaminação oral, o que reforça a importância de obter informações e conhecer a dinâmica desses surtos para contribuir com a prevenção da doença (BRASIL, 2020).

Os jornais, principalmente os regionais, costumam descrever grande parte dos surtos ocorridos em sua localidade concedendo informações de simples acesso e que foram colhidas diretamente das pessoas afetadas, sendo possível obter dados objetivos de cada surto. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão dos casos de doença de Chagas aguda por transmissão via oral, disponíveis na cobertura do jornalismo digital na Amazônia Legal, na região do Brasil onde há mais relatos de surtos no período de junho de 2009 a junho de 2019.

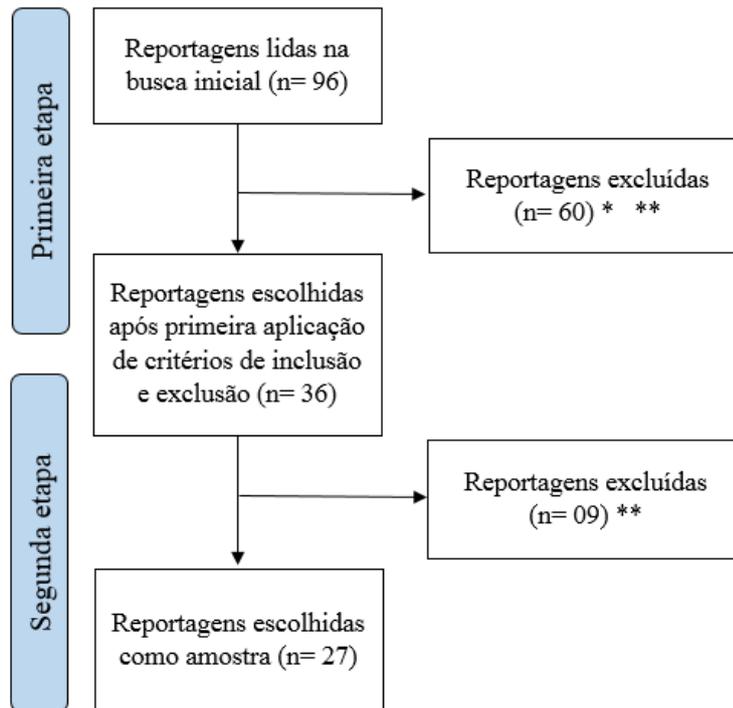
## 2. MATERIAIS E MÉTODO

A Amazônia Legal Brasileira é composta por nove estados: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins; o clima é principalmente equatorial, porém no centro e no sul de Mato Grosso, Maranhão, Tocantins e na porção leste de Roraima há presença do clima tropical (FGV, 2016). O bioma amazônia está presente em todos os estados acima citados, com florestas especialmente úmidas e árvores de grande porte, o bioma cerrado está presente no Maranhão e Tocantins e o bioma pantanal está presente em Mato Grosso; o total pluviométrico de chuvas na foz do rio Amazonas, no litoral do Amapá e no extremo noroeste do Amazonas, está acima de 3.000 mm por ano enquanto que na direção oeste-sudeste que se estende de Roraima ao leste do Pará o total pluviométrico anual chega a 1.700 mm, essa região possui uma precipitação média de aproximadamente 2.300 mm por ano (FGV, 2016).

A coleta de dados foi realizada em duas etapas: a primeira consistiu na pesquisa no Google selecionando a aba notícias para reportagens utilizando os termos: “surto de doença de Chagas e Amazônia”, “doença de Chagas aguda e Amazônia”, “transmissão oral da doença de Chagas e Amazônia”, “doença de Chagas pelo açaí e Amazônia”, “doença de Chagas e Acre”, “doença de Chagas e Amapá”, “doença de Chagas e Amazonas”, “doença de Chagas e Pará”, “doença de Chagas e Rondônia”, “doença de Chagas e Roraima”, “doença de Chagas e Tocantins”, “doença de Chagas e Mato Grosso” e “doença de Chagas e Maranhão”.

Na pesquisa foram encontradas 96 reportagens, essas passaram pela triagem, seguindo os seguintes critérios de inclusão: notícias cujos dados foram referentes a transmissão oral da doença de Chagas; dados compreendidos entre junho de 2009 a junho de 2019; ocorrência dentro da Amazônia Legal brasileira. O fluxograma da seleção pode ser observado na figura 1.

Foram excluídas as reportagens que não se tratavam e/ou não especificavam a via oral como forma de contaminação e as notícias iguais. Após o processo de seleção e identificação dos artigos selecionaram-se 36 reportagens.



**Figura 2.** Fluxograma do processo de Identificação, seleção e inclusão das reportagens.

\*Não especificavam a via de transmissão, \*\*Mesma notícia.

Na segunda etapa, procedeu-se à releitura na íntegra das reportagens por dois pesquisadores, sendo selecionadas apenas as reportagens aprovadas por ambos. Foram excluídas as reportagens que estavam fora do escopo da pesquisa e as falavam dos mesmos surtos, ficando a última atualização disponível e as que se complementavam foram agrupadas, resultando a amostra de 27 notícias.

Após a releitura de cada um dos artigos, preencheu-se um instrumento com as seguintes informações: título, local/ano, casos, óbitos, veículo de transmissão, resumo da explicação do surto e a fonte. Os dados utilizados nesta pesquisa são de livre acesso, não se tratando de documentos que requeiram sigilo ético.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 27 notícias encontradas relataram 19 ocorrências da transmissão oral da DC, nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins (Quadro 1).

**Quadro 1. Resultados da amostra de 27 reportagens sobre a transmissão oral da doença de Chagas aguda na Amazônia legal, no período de junho de 2009 a junho de 2019**

| Título da Reportagem  | Local / Ano                                      | NC | NO | VT    | Resumo da explicação do surto   | Fonte                             |
|---|--|----|----|-------|---|-----------------------------------|
| Belém registra 39 casos da doença de Chagas e duas mortes em 2011   | Belém – Pará, 2011                               | 39 | 02 | Açaí* | Nove pacientes relataram o consumo de açaí em cinco pontos de venda do produto em uma região periférica da cidade.  | (G1-BR, 2011)                     |
| Município de Abaetetuba, PA, tem surto de doença de Chagas  | Abaetetuba – Pará, 2012                          | 11 | 0  | Açaí* | Entre as 11 pessoas que estão doentes, incluía um bateror de açaí e duas pessoas da sua família.  | (G1-PA, 2012)                     |
| Aumenta para 10 o número de casos de doença de Chagas no Tenoné   | Belém – Pará, 2014                               | 10 | 0  | Açaí* | Transmissão da doença teria ocorrido pelo consumo de açaí contaminado.  | (G1-PA, 2014)                     |
| Médico com doença de Chagas morre em hospital particular de Belém   | Belém – Pará, 2015                               | 02 | 01 | Açaí* | Consumiram açaí de um ponto de vendas que fica no bairro da Cidade Velha.   | (G1-PA, 2015)                     |
| Surto de doença de chagas é confirmado em Santarém; seis pessoas foram diagnosticadas   | Santarém – Pará, 2017                            | 06 | 0  | Patuá | Um membro da família que apresentava dores no corpo, dor de cabeça, febre, entre outros sintomas, realizou o exame a pedido do agente, e se constatou a doença de Chagas. Os sintomas começaram a aparecer após o consumo de vinho de patuá.  | (G1-PA, 2017)                     |
| IEC confirma quatro casos de doença de Chagas em São Miguel do Guamá, no Pará   | Miguel do Guamá – Pará, 2018                     | 04 | 0  | Açaí* | Segundo a Vigilância Sanitária, a família atingida pela doença vive em região onde muitas famílias coletam e produzem o açaí que consomem.  | (G1-PA, 2018)                     |
| Mais dois casos de doença de Chagas são confirmados em Acará, no PA; agora são 20 pessoas contaminadas  | Acará – Pará, 2018                               | 20 | 01 | Açaí  | Eles tiveram um jantar no dia 14 de julho e a maioria das pessoas que estavam lá ingeriu açaí em grande quantidade.   | (G1-PA, 2018)                     |
| Município de Tucuruí registra três casos de doença de Chagas  | Tucuruí – Pará, 2018                             | 03 | 0  | Açaí* | A suspeita é que a doença tenha sido contraída pelo consumo do vinho de açaí contaminado pelo barbeiro.   | (Portal Amazônia-PA, 2018)        |
| Com 12 casos, município no AM registra surto de doença de chagas  | Carauari – Amazonas, 2015                        | 12 | 0  | Açaí  | Sinaliza para transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> por via oral e pelo consumo de alimentos contaminados com as fezes do vetor.  | (G1-AM, 2015)                     |
| 1: Sete casos de doença de chagas são confirmados em cidade no AM.<br><br>2: Sobe para 10 nº de casos de doença de chagas no Amazonas, diz FVS                    | Lábrea – Amazonas, 2018                          | 10 | 0  | Açaí  | Uma análise preliminar da Secretaria de Saúde do Amazonas (Susam) constatou que os casos de doença de chagas ocorreram por contaminação do açaí.  | (G1-AM, 2018)<br>(G1-AM, 2018)    |
| 1: Uarini tem seis casos de Doença de Chagas confirmados, diz FVS<br><br>2: Sétimo caso de Doença de Chagas proveniente de Uarini, no AM, é confirmado por FVS    | Uarini – Amazonas, 2019                          | 07 | 0  | Açaí  | O surto é de transmissão oral, aleatório e em um grupo limitado, as pessoas são oriundas de quatro famílias distintas que relataram o consumo de açaí de três pontos de venda diferentes, sendo os fornecedores procedentes das comunidades que ficam à margem do rio Solimões. Os sintomas frequentes dos pacientes foram febre, cefaleia, fraqueza nas pernas e linfonodomegalia. | (G1-AM, 2019)<br>(G1-AM, 2019)    |
| AP tem surto isolado da doença de chagas com 10 registros após festa  | Macapá – Amapá, 2016                             | 10 | 0  | Açaí* | Aconteceu após uma festa familiar em outubro, na Zona Rural de Macapá.  | (G1-AP, 2016)                     |
| 1: Surto de doença de Chagas é confirmado no Amapá; 26 casos foram diagnosticados.<br><br>2: Santana, no AP, registrou 17 casos de doença de chagas em nove meses | Santana, Macapá e Laranjal do Jari – Amapá, 2018 | 28 | 0  | Açaí  | A secretaria explicou que nesta época do ano aumenta o número de casos da doença por causa da safra do açaí, período em que há a maior oferta do produto no mercado a um preço mais barato. Um dos afetados relatou febre e dor de cabeça e nas articulações, além de tontura. O caso chegou a ser confundido com outras doenças, mas o resultado deu positivo para Chagas.         | (G1-AP, 2018)<br>(G1-AP, 2018)    |
| 1: Casal morre com suspeita de doença de Chagas no interior do Acre   | Rodrigues Alves – Acre, 2016                     | 04 | 02 | Açaí  | A família fazia uso do açaí constante, sempre na época do fruto. Como é um consumo artesanal, acreditam que eles não tenham lavado o açaí antes do processo de moer. O pai do jovem morto pela doença, diz  | (CARVALHO, 2016)<br>(MUNIZ, 2016) |

|  |  |    |    |                |  |   |
|--|--|----|----|----------------|--|---|
| 2: Jovem morta com doença de chagas foi contaminada pelo açaí, diz Saúde   |  |    |    |                | já ter visto o inseto várias vezes nos cachos do fruto. "Todo mundo suspeita que foi do açaí. Acredito que tenha sido também porque a gente vê muito o barbeiro nos cachos. Eu já cheguei a ver, mas não sabia que ele causava doença". Outras duas filhas do agricultor também foram diagnosticadas com a doença. Um dos óbitos ocorreu parada cardiorrespiratória, pericardite (inflamação da membrana que envolve o coração) e pneumonia.   |   |
| 1: Paciente com doença de Chagas contesta Saúde e diz que tomou açaí.<br>2: Acre registra 21 casos de doença de chagas em menos de 10 meses  | Feijó – Acre, 2016                       | 15 | 0  | Açaí           | Toda família teria consumido açaí durante um encontro evangélico realizado na comunidade e apresentado sintomas da doença algumas semanas depois. Estávamos em um grupo e o dono da casa ofereceu açaí depois da celebração.   | (G1-AC, 2016)<br>(G1-AC, 2016)                  |
| 1: Família é internada com doença de Chagas no AC e Saúde suspeita de contaminação pelo açaí<br>2: Saúde confirma mais um caso de doença de Chagas em comunidade de Marechal Thaumaturgo, no AC  | Marechal Thaumaturgo – Acre, 2019        | 08 | 0  | Açaí*          | A coordenadora afirma que a suspeita é que a família tenha sido infectada pelo uso do açaí contaminado.<br>"Sentimos febre alta, dor no corpo, inchaço, vômito e agora estamos recebendo o tratamento", relata uma das afetadas pelo surto. O último paciente confirmado contou que também era acostumado a colher açaí nativo na floresta: "Às vezes o cara vai fazer o açaí e machuca o bicho sem saber, porque tem muito, mas a gente não sabia que causava a doença (...). Eu vi agora quando me mostraram um vídeo e tem muito desses nos cachos quando a gente derruba". | (G1-AC, 2019)<br>(G1-AC, 2019)                  |
| Suco de Bacaba contaminou 19 pessoas com Doença de Chagas no Maranhão  | Pedro do Rosário – Maranhão, 2018        | 19 | 0  | Suco de Bacaba | A contaminação se deu por via oral, através da ingestão do suco da bacaba, fruta típica da região amazônica.   | (O IMPARCIAL, 2018)                             |
| 1: Nove pessoas da mesma família são infectadas pela doença de Chagas após beber suco contaminado<br>2: Sobe para 14 o número de pessoas com doença de Chagas após tomar suco contaminado<br>3: Idoso com doença de Chagas morre dois meses após contaminação em massa | Aparecida do Rio Negro – Tocantins, 2018 | 14 | 01 | Suco de Bacaba | Tomaram um suco contaminado durante uma festa em Aparecida do Rio Negro. Parentes contam que fizeram o suco com um tipo de palmeira da Amazônia chamada bacaba. Cerca de dois meses após a contaminação a família confirmou a morte de um idoso do grupo, segundo a família os rins dele estavam paralisados e tinha líquido no pulmão dele. Ele fez uma pequena cirurgia, uma espécie de drenagem para retirar esse líquido, e depois passou mal. Tentaram reanimar, mas infelizmente ele não resistiu.   | (G1-TO, 2018)<br>(G1-TO, 2018)<br>(G1-TO, 2018) |
| Número de casos suspeitos de Chagas chega a 79 após suco contaminado em Araguaína  | Araguaína – Tocantins, 2019              | 07 | 0  | Suco de Bacaba | O surto foi causado pelo consumo de suco de bacaba que foi colhida no assentamento Barra Bonita, na zona rural de Carmolândia. Uma das afetadas relatou os sintomas: "A gente sente a cabeça ruim, aquela coisa ruim por dentro, senti as minhas pernas, que eu estava inchada, pesada. Para andar, parecia que as pernas estavam grossas, pesadas para caminhar".   | (G1-TO, 2019)                                   |

\*Suspeita; NC: Número de Casos; NO: Número de óbitos; VT: Veiculo de Transmissão.

O estado com maior número de casos relatados por jornais neste estudo foi o Pará, com oito notícias e com um total de 95 pessoas com a DC aguda e 4 óbitos, tanto historicamente como na atualidade na literatura este estado se mantém como um dos que mais apresentaram surtos da DC aguda por ano (FERREIRA, BRANQUINHO, LEITE, 2014). Nesse estado já foram confirmadas a ocorrência de nome espécies de triatomíneos:

*Eratyrus mucronatus* Stål, 1859, *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *Panstrongylus lignarius* (Walker, 1873), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899), *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973, *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872, *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (OLIVEIRA; ROSA; ALEVI, 2019), porém acredita-se que a espécies ligadas aos surtos seja as do gênero *Rhodnius*, visto a ecologia das mesmas, que estão ligadas as palmeiras (MENEGUETTI et al., 2012).

Outros estados com surtos registrados foram o Amazonas teve três surtos envolvendo 29 pessoas, o Amapá apresentou duas ocorrências de DC oral com 38 pessoas, o Acre teve três surtos com 27 pessoas dentre elas dois óbitos, o Maranhão teve um surto com 19 pessoas e o Tocantins teve dois surtos noticiados totalizando 21 pessoas infectadas dentre elas um óbito (tabela 1).

**Tabela 1.** Notícias sobre a doença de Chagas aguda na Amazônia Legal, entre junho de 2009 a junho de 2019

| Estado    | Notícias |        | Casos |        | Óbitos |        |
|-----------|----------|--------|-------|--------|--------|--------|
|           | n        | %      | n     | %      | n      | %      |
| Pará      | 8        | (42%)  | 95    | (41%)  | 4      | (57%)  |
| Amazonas  | 3        | (16%)  | 29    | (13%)  | 0      | (0%)   |
| Acre      | 3        | (16%)  | 27    | (12%)  | 2      | (29%)  |
| Amapá     | 2        | (10%)  | 38    | (17%)  | 0      | (0%)   |
| Tocantins | 2        | (10%)  | 21    | (9%)   | 1      | (14%)  |
| Maranhão  | 1        | (6%)   | 29    | (8%)   | 0      | (0%)   |
| TOTAL     | 19       | (100%) | 229   | (100%) | 7      | (100%) |

De acordo com a literatura entre os anos de 1968 a 2010 foram descritos 149 surtos distribuídos pelos estados do Pará (80%), Amapá (15%), Acre (2%), Amazonas (1,5%) e Maranhão (1,5%) (FERREIRA, BRANQUINHO, LEITE, 2014). Durante os anos de 2012 a 2016 o Pará manteve sua porcentagem de 80% de casos notificados em relação aos demais estados brasileiros, sendo que pouco mais de 98% dos casos confirmados no país foram dos estados da Amazônia Legal com exceção de Mato Grosso que não registrou nenhum caso. Neste estudo também não foi encontrado nenhuma notícia relacionada e este estado, assim como a ausência de notícias sobre Rondônia e Roraima que podem estar relacionadas as raras notificações, nesses cinco anos foram relatados somente 3 casos de DC em cada um destes estados (BRASIL, 2019).

Em decorrência dos surtos houveram sete óbitos noticiados ocorrendo em intervalo próximo a data de contaminação variando em dias e alguns em meses, um dos óbitos ocorreu pericardite, pneumonia e parada cardiorrespiratória, outro ocorreu após complicações renal e pulmonar, mostrando o potencial da forma aguda da DC na contaminação oral sendo mais agressiva e rápida (SANTANA et al., 2019).

Quanto ao ano foi possível ver que no ano de 2018 foram noticiados mais casos de DC com 7 notícias, sendo que apenas o Pará representa 3 destas. Nos anos de 2009, 2010 e 2013 não foram encontradas notícias que correspondesse aos critérios de inclusão do presente estudo.

Os alimentos envolvidos foram os frutos das palmeiras *Euterpe oleracea*, *Oenocarpus bacaba* e *Oenocarpus bataua*, conhecidos como açaí, bacaba e patuá ou patauá respectivamente (NEVES et al, 2015; RODRIGUES et al, 2019). O vinho do Patuá contaminado que foi relatado apenas uma vez como causador de um surto no município de Santarém no estado do Pará e todos os outros sete surtos neste mesmo estado estavam vinculados ao açaí; no estado do Acre, Amazonas e do Amapá a contaminação ocorreu exclusivamente pelo consumo do açaí (Figura 2), assim como LIMA relatou 17 casos da DC aguda no Amazonas onde todos os pacientes tinham feito o consumo do Açaí (SOUZA-LIMA et al. 2013).



**Figura 3.** Distribuição da doença de Chagas aguda na Amazônia Legal segundo o veículo de transmissão oral, entre 2019 a 2019.

O suco da Bacaba contaminado foi relatado como o único envolvido na infecção oral da DC apenas no Maranhão e Tocantins. Correa et al. (2014) descreveram um caso em Tocantins, onde 11 pessoas incluindo entre elas uma gestante, foram infectadas pelo *T. cruzi* após ingerirem o suco da Bacaba. A contaminação via oral apresenta grande potencial para casos graves da DC visto que houve um curto período de tempo entre a infecção e os óbitos relatados nas notícias, além disso a dinâmica encontrada nas explicações de cada reportagem, em sua maioria ocorreu em ambiente familiar ou em reuniões onde muitas pessoas ingeriram o mesmo alimento contaminado com o *T. cruzi*, afetando várias pessoas de uma mesma família assumindo um perfil complexo de expansão da DC aguda na região amazônica (SOUZA-LIMA et al. 2013).

Os sintomas relatados pelas pessoas foram: febre, cefaleia, fraqueza principalmente nas pernas, linfonodomegalia, dor nas articulações, tontura, dor no corpo, inchaço e vômito. Como a malária é endêmica em grande parte da região da Amazônia Legal, conforme na literatura, fez parte da dinâmica dos surtos excluir inicialmente o diagnóstico dessa doença, pois nessa região para os profissionais uma das principais suspeitas de síndrome febril é a malária (ARNAL et al, 2019; SANTANA et al., 2019). Segundo Santana et al. (2019) os pacientes envolvidos em um surto por contaminação oral costumam apresentar sintomas muito similares já que todos ingeriram o mesmo alimento que fora contaminado com o mesmo DTU do *T. cruzi* (SANTANA et al., 2019).

O açaí é um alimento comum na Região Amazônica, onde o seu consumo é realizado, muitas vezes, imediatamente após o seu processamento sem qualquer tratamento térmico. Outro ponto também importante é o fato das pessoas terem relatado que não tinham conhecimento de como é um triatomíneo, assim como não sabiam que era o transmissor de *T. cruzi*, agente causal da DC.

De acordo com Passos (2012) o açaí contaminado com o *T. cruzi* é referido como o principal alimento associado a ocorrência dos casos de doença de Chagas aguda na região Amazônica. Além da má qualidade sob o ponto de vista microbiológico por serem detectados altos níveis de coliformes fecais, bolores e leveduras, o açaí também está frequentemente contaminado com o *T. cruzi*, necessitando programas de capacitação para os produtores, implementação de tecnologia para melhorar o processamento e a qualidade junto a uma fiscalização estrita. Tal fato, representa não só uma solução para a saúde pública como também um investimento para a valorização da comercialização do açaí, essas medidas já foram implementadas no estado do Pará (FERREIRA; BRANQUINHO, LEITE, 2014).

Em um estudo com o objetivo de determinar o processo térmico mínimo necessário para desativar o *T. cruzi* na polpa de açaí, mostrou que o aquecimento da polpa de açaí acima de 43 ° C por 20 min é uma medida prática e eficaz para prevenir DC de origem alimentar (BARBOSA et al., 2016). Em outro estudo a sobrevivência do *T. cruzi* na polpa de açaí submetida a diferentes tratamentos como refrigeração a 4°C por 144 horas ou congelamento a -20°C por 26 horas e em ar ambiente por 24 horas foi confirmada, assim como a preservação da virulência do parasito, demonstrando que a transmissão da DC aguda por açaí é possível (PASSOS et al., 2012).

Medidas de prevenção da contaminação oral da DC como boas práticas de higiene em todo o processo de produção, cozimento adequado de alimentos, pasteurização da pasta de açaí na produção em grande escala e branqueamento em bateadeiras artesanais, são formas de prevenir a transmissão da DC por via oral e evita conseqüentemente surtos, essas medidas devem ser implementadas em todas as escalas de produção, tanto para o comercio local, exportação ou para consumo *in natura* (FERREIRA, BRANQUINHO, LEITE, 2014).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os casos de doença de Chagas aguda concentram-se principalmente na região da Amazônia Legal sendo o estado do Pará o maior responsável por esses números, tanto na literatura quanto relatados por jornais neste estudo. No entanto os surtos por contaminação oral apresentam episódios aleatórios, sendo fundamental realizar estudos em todos os estados com circulação do vetor. O principal alimento contaminado envolvido nos surtos foi o açaí, é preciso lembrar que apesar dos esforços da comunidade científica ainda há casos em que esses alimentos são preparados de forma artesanal, como visto nesse estudo, alguns foram produzidos pelas próprias pessoas que adquiriram a doença, que alegaram não ter conhecimento que o triatomíneo albergava o agente etiológico que causa a DC. Dessa forma é necessário que a informação sobre controle do vetor e processos que eliminem o *T. cruzi* dos alimentos sejam amplamente divulgados, que assim como os jornais chegam ao dia a dia de todas as pessoas, que o conhecimento científico também seja aliado do saber popular.

## 5. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, G. **Belém registra 39 casos da doença de Chagas e duas mortes em 2011.** G1 Brasil - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2011/10/belem-registra-39-casos-da-doenca-de-chagas-e-duas-mortes-em-2011.html>>, acesso em 20/10/2011.
- ARNAL, A.; WALECKX, E.; RICO-CHÁVEZ, O.; HERRERA, C.; DUMONTEIL, E. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n.4, p. 1-19, 2019.
- BATALHA, M. **Suco de Bacaba contaminou 19 pessoas com Doença de Chagas no Maranhão.** O Imparcial. Disponível em <<https://oimparcial.com.br/noticias/2018/02/suco-de-bacaba-por-ter-contaminado-19-com-doenca-de-chagas/>>, acesso em 26/02/2018.
- BARBOSA, R. L.; PEREIRA, K. S.; DIAS, V. L.; SCHMIDT, F. L.; ALVES, D. P.; GUARALDO, A. M. A; et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* in Açai (*Euterpe oleraceae Martius*) Pulp following Mild Heat Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 10, p. 1807-1812, 2016.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, n. 2, p. 1-10, 2019.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 51, n. esp, p. 1-45, 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, n. 36, p. 1-14, 2019.
- CARVALHO, A. **Casal morre com suspeita de doença de chagas no interior do Acre.** G1 Acre - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2016/03/casal-morre-com-suspeita-de-doenca-de-chagas-no-interior-do-acre.html>>, acesso em 01/03/2016.
- CAVALCANTI, L. P. G.; ROLIM, D. B.; PIRES NETO, R. J.; VILAR, D. C. L. F.; NOGUEIRA, J. O. L.; POMPEU, M. M. L.; et al. Microepidemics of acute Chagas disease by oral transmission in Ceará. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 17, n. 4, p. 911-921, 2009.
- CORREA, V. R.; BARBOSA, F. G.; MELO JUNIOR, C. A.; CASTRO, L. F. D.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; NASCIMENTO, N. Uneventful benznidazole treatment of acute Chagas disease during pregnancy: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 397-400, 2014.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n. 3, p. 227-282, 2015.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n.1-2, p. 5-13, 2010.
- FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açai: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 4, p. 4-11, 2014.

FIDALGO, A. S. O. B. V.; COSTA, A. C.; SILVA-FILHO, J. D.; CANDIDO, D.; FREITAS, E. C.; PEREIRA, L. S.; et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174-182, 2018.

FIGUEIRA, C. B.; TAKAD, J. P. Z.; BARBOSA, G. A. F.; MARTINS, K. L. M.; ARAUJO, L. M.; SOUZA, L. B. et al. Reincidência da doença de chagas no Brasil por vias alternativas de transmissão: revisão sistemática. **Revista de Patologia de Tocantins**. v. 6, n. 2, p. 61-64, 2019.

FIGUEIREDO, F. **AP tem surto isolado da doença de chagas com 10 registros após festa**. G1 - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/ap/amapa/noticia/2016/12/ap-tem-surto-isolado-da-doenca-de-chagas-com-10-registros-apos-festa.html>>, acesso em 23/12/2016.

FIGUEIREDO, F. **Santana, no AP, registrou 17 casos de doença de chagas em nove meses**. G1 Amapá - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<https://g1.globo.com/ap/amapa/noticia/2018/10/24/santana-no-ap-registrou-17-casos-de-doenca-de-chagas-em-nove-meses.ghtml>>, acesso em 24/10/2018.

FGV. Fundação Getúlio Vargas. **AMAZÔNIA LEGAL: PROPOSTAS PARA UMA EXPLORAÇÃO AGRÍCOLA SUSTENTÁVEL**. p. 1-232, 2016.

G1 AM. G1 Amazonas - O portal de notícias da Globo. **Com 12 casos, município no AM registra surto de doença de chagas**. Disponível em <<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2015/01/com-12-casos-municipio-no-am-registra-surto-de-doenca-de-chagas.html>>, acesso em 06/01/2015.

G1 AM. G1 Amazonas - O portal de notícias da Globo. **Sete casos de doença de chagas são confirmados em cidade no AM**. Disponível em <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/sete-casos-de-doenca-de-chagas-sao-confirmados-em-cidade-no-am.ghtml>>, acesso em 09/01/2018.

G1 AM. G1 Amazonas - O portal de notícias da Globo. **Sétimo caso de Doença de Chagas proveniente de Uarini, no AM, é confirmado por FVS**. Disponível em <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2019/06/19/setimo-caso-de-doenca-de-chagas-proveniente-de-uarini-no-am-e-confirmado-por-fvs.ghtml>>, acesso em 19/06/2019.

G1 AM. G1 Amazonas - O portal de notícias da Globo. **Sobe para 10 nº de casos de doença de chagas no Amazonas, diz FVS**. Disponível em <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/sobe-para-10-n-de-casos-de-doenca-de-chagas-no-amazonas-diz-fvs.ghtml>>, acesso em 12/01/2018.

G1 AM. G1 Amazonas - O portal de notícias da Globo. **Uarini tem seis casos de Doença de Chagas confirmados, diz FVS**. Disponível em <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2019/06/10/uarini-tem-seis-casos-de-doenca-de-chagas-confirmados-diz-fvs.ghtml>>, acesso em 10/06/2019.

G1 AP. G1 Amapá - O portal de notícias da Globo. **Surto de doença de Chagas é confirmado no Amapá; 26 casos foram diagnosticados**. Disponível em <<https://g1.globo.com/ap/amapa/noticia/2018/08/28/surto-de-doenca-de-chagas-e-confirmado-no-amapa-26-casos-foram-diagnosticados.ghtml>>, acesso em 28/08/2018.

G1 PA. G1 Pará - O portal de notícias da Globo. **Aumenta para 10 o número de casos de doença de Chagas no Tenoné**. Disponível em <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2014/11/aumenta-para-10-o-numero-de-casos-de-doenca-de-chagas-no-tenone.html>>, acesso em 17/11/2014.

G1 PA. G1 Pará - O portal de notícias da Globo. **IEC confirma quatro casos de doença de Chagas em São Miguel do Guamá, no Pará.** Disponível em <<https://g1.globo.com/pa/para/noticia/2018/09/03/iec-confirma-quatro-casos-de-doenca-de-chagas-em-sao-miguel-do-guama-no-para.ghtml>>, acesso em 03/09/2018.

G1 PA. G1 Pará - O portal de notícias da Globo. **Mais dois casos de doença de chagas são confirmados em Acará, no PA; agora são 20 pessoas contaminadas.** Disponível em <<https://g1.globo.com/pa/para/noticia/2018/08/20/mais-dois-casos-de-doenca-de-chagas-sao-confirmados-em-acara-no-pa-agora-sao-20-pessoas-contaminadas.ghtml>>, acesso em 20/08/2018.

G1 PA. G1 Pará - O portal de notícias da Globo. **Médico com doença de Chagas morre em hospital particular de Belém.** Disponível em <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2015/07/medico-com-doenca-de-chagas-morre-em-hospital-particular-de-belem.html>>, acesso em 09/07/2015.

G1 PA. G1 Pará - O portal de notícias da Globo. **Município de Abaetetuba, PA, tem surto de doença de Chagas.** Disponível em <<http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2012/08/municipio-de-abaetetuba-pa-tem-surto-de-doenca-de-chagas.html>>, acesso em 22/08/2012.

G1 PA. G1 Santarém - O portal de notícias da Globo. **Surto de doença de chagas é confirmado em Santarém; seis pessoas foram diagnosticadas.** Disponível em <<https://g1.globo.com/pa/santarem-regiao/noticia/surto-de-doenca-de-chagas-e-confirmado-em-santarem-seis-pessoas-foram-diagnosticadas.ghtml>>, acesso em 19/09/2017.

G1 TO. G1 Tocantins - O portal de notícias da Globo. **Idoso com doença de Chagas morre dois meses após contaminação em massa.** Disponível em <<https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2019/01/25/idoso-com-doenca-de-chagas-morre-dois-meses-apos-contaminacao-em-massa.ghtml>>, acesso em 25/01/2019.

G1 TO. G1 Tocantins - O portal de notícias da Globo. **Nove pessoas da mesma família são infectadas pela doença de Chagas após beber suco contaminado.** Disponível em <<https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2018/12/08/nove-pessoas-da-mesma-familia-sao-infectadas-pela-doenca-de-chagas-apos-beber-suco-contaminado.ghtml>>, acesso em 08/12/2018.

G1 TO. G1 Tocantins - O portal de notícias da Globo. **Sobe para 14 o número de pessoas com doença de Chagas após tomar suco contaminado.** Disponível em <<https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2018/12/11/sobe-para-14-o-numero-de-pessoas-com-doenca-de-chagas-apos-tomar-suco-contaminado.ghtml>>, acesso em 11/12/2018.

GARCIA, M. N.; AGUILAR, D.; GORCHAKOV, R.; ROSSMANN, S. N.; MONTGOMERY, S. P.; RIVERA, H.; et al. Case Report: Evidence of Autochthonous Chagas Disease in Southeastern Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n.2, p. 325-330. 2015.

LIMA, S. C. G.; ARAÚJO, E. C. Chagas disease: for the less than 1200 cases in the state of Ceará in 2013. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 850-861, 2019.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.5, p. 483-485, 2010.

MÉNDEZ, A. R.; ALDASORO, E.; LAZZARI, E.; SICURI, E.; BROWN, M.; MOORE, D. A. J.; et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin- American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p.1-15, 2015.

MENEGUETTI, D.U.O.; TREVISAN, O.; CAMARGO, L.M.A.; ROSA, R.M. Natural infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) by trypanosomatids in two different environments in the municipality of Ouro Preto do Oeste, State of Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p.395-398, 2012.

MIRANDA-SCHAEUBINGER, M.; CHAKRAVARTI, I.; LIDANI, K. C. F.; OMIDIAN, Z.; GILMAN, R. H. Systematic Review of the Epidemiology of Chagas Disease in the Americas: a Call for Standardized Reporting of Chagas Disease Prevalence. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2019.

MUNIZ, T. **Jovem morta com doença de chagas foi contaminada pelo açaí, diz Saúde**. G1 Acre - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2016/03/jovem-morta-com-doenca-de-chagas-foi-contaminada-pelo-acai-diz-saude.html>>, acesso em 12/03/2016.

NASCIMENTO, A. **Paciente com doença de chagas contesta Saúde e diz que tomou açaí**. G1 Acre - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2016/07/paciente-com-doenca-de-chagas-contesta-saude-e-diz-que-tomou-acai.html>>, acesso em 26/07/2016.

NEVES, L. T. B. C.; CAMPOS, D. C. S.; MENDES, J. K. S.; URNHANI, C. O.; ARAÚJO, K. G. M. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*euterpe oleracea* mart.) e bacaba (*oenocarpus bacaba* mart.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 729-738, 2015 .

NUNES, M. C. P.; BEATON, A.; ACQUATELLA, H.; BERN, C.; BOLGER, A. F.; ECHEVERRÍA, L. E.; et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v.138, p.169-209, 2018.

OLIVEIRA, J.; ROSA, J.A.; ALEVI, K.C.C. **Vetores da Doença de Chagas na Amazônia Ocidental**. In: MENEGUETTI, D.U.O.; SILVA, R.P (Org.). *Ciência da saúde na Amazônia Ocidental*. 1ed. Rio Branco: Strictus Sensu, v. 1, p. 11-30, 2019.

OLIVEIRA, G. F.; RIBEIRO, M. A. L.; CASTRO, G. V. S.; MENEZES, A. L. R.; LIMA, R. A.; SILVA, R. P. M.; et al. Retrospective study of the epidemiological overview of the transmission of Chagas disease in the State of Acre, South-Western Amazonia, from 2009 to 2016. **Journal of Human Growth and Development**, v. 28, n. 3, p. 329-336, 2018.

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em <<https://www.who.int/chagas/epidemiology/en>>, acesso em 31/12/2019.

ORTIZ ,J. V.; PEREIRA, B. V. M.; COUCEIRO, K. N.; SILVA, M. R. H. S.; DORIA, S. S.; SILVA, P. R. L.; et al. Avaliação Cardíaca na Fase Aguda da Doença de Chagas com Evolução Pós-Tratamento em Pacientes Atendidos no Estado do Amazonas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 112, n. 3, p. 240-246, 2019.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; BARBOSA, R. L.; DIAS, V. L.; PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L. et al. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açaí: estudo in vitro e in vivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 2, p. 223-232, 2012.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p.441-446, 2008.

Portal Amazônia, com informações da Agência Brasil. **Município de Tucuruí registra três casos de Doença de Chagas**. Disponível em

<<http://portalamazonia.com/noticias/municipio-de-tucuruui-registra-tres-casos-de-doenca-de-chagas>>, acesso em 09/03/2018.

RODRIGUES, I. **Acre registra 21 casos de doença de chagas em menos de 10 meses.** G1 - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<http://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2016/10/acre-registra-21-casos-de-doenca-de-chagas-em-menos-de-10-meses.html>>, acesso em 17/10/2016.

RODRIGUES, I.; ROGÉRIO, M. **Família é internada com doença de chagas no AC e Saúde suspeita de contaminação pelo açaí.** G1 Acre - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<https://g1.globo.com/ac/cruzeiro-do-sul-regiao/noticia/2019/05/31/familia-e-internada-com-doenca-de-chagas-no-ac-e-saude-suspeita-de-contaminacao-pelo-acai.ghtml>>, acesso em 31/05/2019.

RODRIGUES, J. J. P.; LEMOS, R. G.; LIMA, R. A. O Uso do Extrato Aquoso da Casca do Patauá (*Oenocarpus Bataua* Mart.) Como Indicador Natural Ácido-Base para o Ensino de Química. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n.1, p. 1-16, 2019.

ROGÉRIO, M. **Saúde confirma mais um caso de doença de chagas em comunidade de Marechal Thaumaturgo, no AC.** G1 Acre - O portal de notícias da Globo. Disponível em <<https://g1.globo.com/ac/cruzeiro-do-sul-regiao/noticia/2019/06/06/saude-confirma-mais-um-caso-de-doenca-de-chagas-em-comunidade-de-marechal-thaumaturgo-no-ac.ghtml>>, acesso em 06/06/2019.

SANTANA, R. A. G.; GUERRA, M. G. V. B.; SOUSA, D. R.; COUCEIRO, K.; ORTIZ, J. V.; OLIVEIRA, M.; et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n.1, p. 132-135, 2019.

SANTOS, F. S.; RAMOS, K. S.; BRUM, G. G. G.; GAIA, I. A.; PEREIRA, S. S. P.; VIEIRA, A. L. Chagas disease and its transmission by açaí: a bibliographic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 2128-2144, 2019.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. suppl. I, p. 75-85, 2007.

SOUZA-LIMA, R. C.; BARBOSA, M. G. V.; COURA, J. R.; ARCANJO, A. R. L.; NASCIMENTO, A. S.; FERREIRA, J. M. B. B. et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 510-514, 2013.

TV Anhanguera, G1 - O portal de notícias da Globo. **Número de casos suspeitos de Chagas chega a 79 após suco contaminado em Araguaína.** Disponível em <<https://g1.globo.com/to/tocantins/noticia/2019/02/12/numero-de-casos-suspeitos-de-chagas-chega-a-79-apos-suco-contaminado-em-araguaina.ghtml>>, acesso em 12/02/2019.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**. v. 31, p. 472-481, 2001.

## A DOENÇA DE CHAGAS NO CONTEXTO DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Adriana Benatti Bilheiro<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO:

A doença de Chagas é uma importante doença tropical representando grande problema de saúde pública na América Latina. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae a uma variedade de mamíferos incluindo o homem. A Amazônia brasileira tem chamado atenção nos últimos anos pelo aumento do número de casos agudos da doença de Chagas através da transmissão oral. Ademais, outros mecanismos de transmissão, como a via domiciliar sem colonização e a via extradomiciliar passaram a ter importância como vias alternativas de transmissão do *T. cruzi* nessa região. Além disso, o grande número de espécies de vetores autóctones e mamíferos reservatórios mantém o complexo ciclo de transmissão do *T. cruzi* na floresta amazônica, representando, assim, um desafio para a redução dos eventos de transmissão da doença de Chagas humana. Com isso, é necessária a implementação de ações de vigilância epidemiológica em toda a região da Amazônia e a elaboração de estratégias de controle eficazes para redução dos eventos de transmissão.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Amazônia e *Trypanosoma cruzi*.

### ABSTRACT

Chagas disease is an important tropical illness that represent a great public health problem in Brazil. It's caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and transmitted by hematophagous insects belonging to the subfamily Triatominae to a variety of mammals including men. The Brazilian Amazon has drawn attention in the last few years for the increase of the acute cases of Chagas disease, mostly by oral transmission. In addition, other transmission mechanisms poorly understood like the intrusions of sylvatic vectors on domiciles and the extradomiciliar transmission events became important alternatives of transmission routes of *T. cruzi* in this region. Besides that, the presence of a large number of sylvatic vector species and wild mammal reservoirs keeps *T. cruzi* in the Amazon rainforest in complex transmission. Thus, it's necessary to implement surveillance actions in all the Amazon region and creating control strategies to reduce the transmission of the disease.

**Keywords:** Chagas disease, Amazon and *Trypanosoma cruzi*.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (tripanosomíase americana) é uma antropozoonose de curso crônico com elevada prevalência em áreas endêmicas e, quando transmitida através da ingestão de alimentos contaminados possui elevada morbimortalidade (DIAS et al., 2016). É causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS 1909) transmitido a partir da deposição de fezes/urina de insetos hematófagos, os triatomíneos, contaminadas com as formas infectantes do parasito (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

A descrição da doença, bem como de seu agente etiológico, foram feitas pelo médico sanitário Carlos Justiniano das Chagas em 1909, enquanto chefiava os trabalhos de combate à malária no estado de Minas Gerais (CHAGAS 1909). A descoberta histórica de Carlos Chagas recebe destaque pelo êxito em descrever não só o agente etiológico *T. cruzi*, mas também a sua biologia nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (vetores), bem como, os aspectos clínicos da doença (GALVÃO; JUSTI, 2015).

Atualmente, mais de 100 anos após sua descoberta, a doença de Chagas continua sendo considerada importante problema de saúde pública, sendo altamente negligenciada na América Latina (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se em cerca de 8 milhões o número de pessoas infectadas e em aproximadamente 12.000 o número de mortes anuais (SANTOS et al., 2018). Além disso, cerca de 65 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco de adquirirem a doença principalmente pela transmissão vetorial, oral, vertical, ou por meio de transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos (VIGLIANO et al., 2020).

Inicialmente, sua distribuição se limitava ao continente americano, no entanto, em decorrência do intenso processo de migração internacional, juntamente ao seu caráter crônico, a doença de Chagas tem alcançado países não endêmicos como Canadá, Estados Unidos, Espanha, Japão e Austrália (BARBOSA et al., 2015; DIAS et al., 2016).

No Brasil, apesar do impacto das estratégias de controle vetorial na redução da prevalência da doença, esta continua representando importante problema de saúde pública (DIAS et al., 2016). Estima-se em 1.156.821 o número de infectados a maioria deles ocorrendo na Amazônia brasileira (MS-SVS 2019).

Atualmente, a maioria dos casos agudos registrados na região amazônica se relaciona à ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi*, principalmente polpas de frutas como açaí e bacaba (SANTOS et al., 2018). Adicionalmente, observa-se a

transmissão em caráter endêmico por outros mecanismos mal caracterizados como a via de transmissão vetorial domiciliar sem colonização e a via vetorial extradomiciliar (SVS-MS 2019).

Com isso, destaca-se a necessidade de implementação de ações de vigilância epidemiológica em toda a região da Amazônia brasileira, bem como a investigação continuada das populações que vivem em áreas de risco de transmissão (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

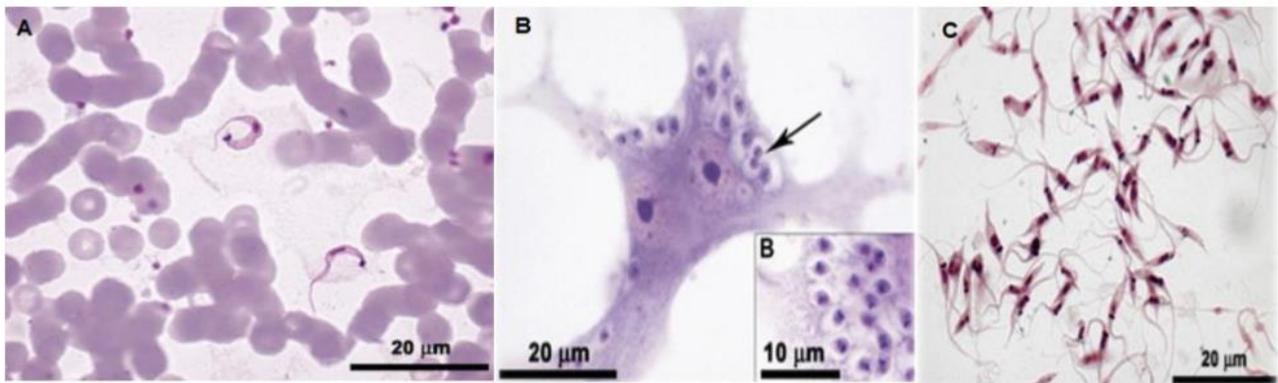
### 2.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

#### 2.1.1 O agente etiológico *T. cruzi*

O *T. cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), é um protozoário flagelado que apresenta distintas formas evolutivas entre seus hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos) no decorrer do seu ciclo de desenvolvimento (JUNQUEIRA et al., 2011).

Nos vertebrados, observam-se as formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 1A), presentes nos fluidos tissulares, e as formas amastigotas (Figura 1B), que se multiplicam no interior de vários tipos celulares, preferencialmente de origem mesenquimal (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011). As formas tripomastigotas sanguíneas apresentam-se delgadas, intermediárias ou largas (LANA et al., 2016).

No inseto vetor, observam-se as formas esferomastigotas e epimastigotas (Figura 1C) que se dividem ativamente e se diferenciam na forma infectante para mamíferos, tripomastigota metacíclica na ampola retal do inseto (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011). Embora a forma infectante do *T. cruzi* também seja encontrada na glândula de cheiro do marsupial sinantrópico *Didelphis* spp., não se sabe ao certo qual a importância epidemiológica que a secreção da glândula infectada teria na transmissão (JANSEN et al., 1991).



**Figura 1.** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.

(A) Formas tripomastigotas sanguíneas; (B) Formas amastigotas em cultura de células; (C) formas epimastigotas no trato gastrointestinal do vetor. Adaptado de Lana et al. (2016).

### 2.1.2 Biologia

Os triatomíneos, vetores da doença de Chagas, se infectam no momento do repasto sanguíneo, ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* presentes no sangue periférico de mamíferos infectados (LANA et al., 2016).

No inseto, as formas tripomastigotas ingeridas se diferenciam em formas arredondadas denominadas esferomastigotas que posteriormente, irão se diferenciar em formas epimastigotas no trato gastrointestinal do inseto (KOLLIEN; SCHAUB, 2000, COURA; CASTRO, 2002).

As formas epimastigotas se multiplicam ativamente por divisão binária mantendo a infecção no vetor e dando origem a formas tripomastigotas metacíclicas na ampola retal do triatomíneo (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

No momento do repasto sanguíneo, formas tripomastigotas metacíclicos serão eliminadas junto às fezes e/ou urina do vetor podendo penetrar na solução de continuidade na pele ou em mucosa íntegra de mamíferos (LANA et al., 2016).

Nos mamíferos, as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes irão interagir primariamente com células do sistema mononuclear fagocitário, para, posteriormente, penetrar em diferentes tipos celulares como células epiteliais, cardiomiócitos ou células da musculatura lisa. No interior das células o parasito perde o flagelo e adquire uma pequena forma circular denominada amastigota (COURA; CASTRO, 2002). Após sucessivas divisões binárias, as formas amastigotas se diferenciarão em formas tripomastigotas sanguíneas, infectantes para o inseto vetor (COURA; CASTRO, 2002).

### 2.1.3 A doença

As manifestações clínicas da doença de Chagas, de um modo geral, compreendem uma fase aguda e uma fase crônica (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011).

A fase aguda pode ser assintomática, mais frequentemente, ou sintomática, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e carga infectante (LANA et al., 2016). Pode se observar inflamação no sítio de inoculação (chagoma de inoculação), sinal de Romaña (Edema bipalpebral unilateral, quando a porta de entrada é a conjuntiva), febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia e em alguns casos, insuficiência cardíaca (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011). Nas fases iniciais da doença, observa-se, frequentemente, a positividade em exames parasitológicos como gota espessa de sangue e esfregaço sanguíneo.

A fase crônica, por sua vez, pode ser assintomática, sendo caracterizada pela positividade em exames sorológicos ou moleculares para *T. cruzi*, ausência de sintomas e eletrocardiograma convencional normal (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Na fase crônica sintomática, observam-se sintomas relativos ao sistema cardiocirculatório, digestivo ou ambos (LANA et al., 2016).

A forma cardíaca, mais frequente, ocorre em 14 a 45% dos pacientes crônicos e é caracterizada principalmente pela ocorrência de insuficiência cardíaca congestiva em consequência da reação inflamatória e fibrose do coração (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A forma digestiva é menos comum e afeta entre 10 e 21% dos pacientes crônicos e é caracterizada principalmente pela ocorrência de megaesôfago e megacólon (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Estes quadros clínicos podem aumentar significativamente o risco de câncer de esôfago e câncer coloretal (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

## 2.2 A DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Bem como em toda a Pan Amazônia, a doença de Chagas na Amazônia brasileira era inicialmente uma doença de caráter enzoótico, mantida por milhares de anos entre triatomíneos e mamíferos silvestres (COURA; JUNQUEIRA, 2015). Posteriormente, a doença passou a ser transmitida a seres humanos quando estes invadiram os ecótopos silvestres e pelo intenso processo de deflorestamento (COURA 2015).

Em anos recentes, observou-se um aumento do número de casos agudo e crônicos na região da Amazônia brasileira reiterando que a doença é endêmica na região e apresenta distintas características regionais (BARBOSA et al., 2015).

Assim, faz-se necessário um maior entendimento quanto a esses cenários epidemiológicos regionais e sua dinâmica de transmissão na busca por ações em vigilância e controle mais efetivas e eficazes (DIAS et al., 2016).

### **2.2.1 A Amazônia brasileira**

A Amazônia brasileira é um vasto território que ocupa 57,23% do território nacional e corresponde a 67% dos 7.275,300 km<sup>2</sup> da chamada “Pan Amazônia”. O território da Amazônia brasileira é dividido entre nove estados, sendo eles: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Rondônia, Roraima, Pará e Tocantins (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

A região amazônica é caracterizada pela rica biodiversidade, apresentando um maior e mais diverso número de espécies do que se observa em outras formações florestais (REZENDE 1998). Por essa razão, há uma ampla variedade de espécies de vetores e mamíferos reservatórios nessa região (GALVÃO et al., 2003).

A ocupação desordenada do território e o intenso processo de deflorestamento representam os mais importantes problemas da região amazônica (COURA 2015). Esse cenário é responsável por um desequilíbrio que facilita a transmissão de inúmeros patógenos (MASSARO et al., 2008).

### **2.2.2 Epidemiologia**

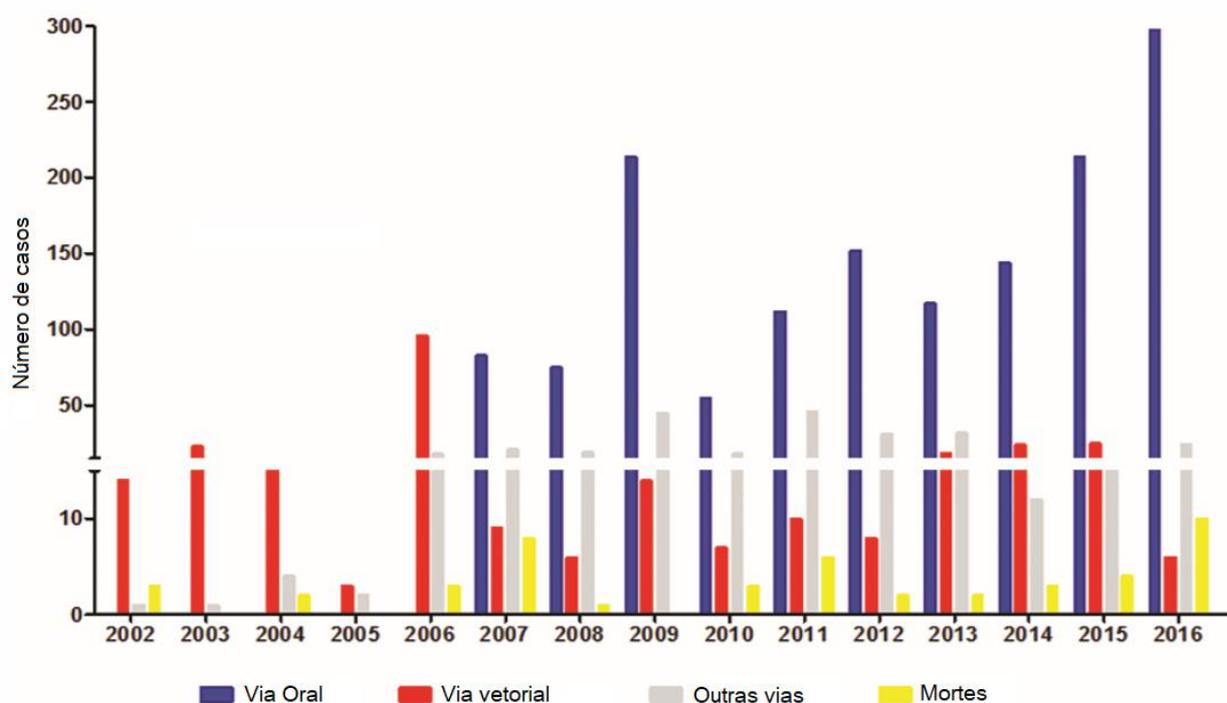
No Brasil, observa-se que o perfil epidemiológico da doença de Chagas se alterou substancialmente em decorrência do sucesso das campanhas de controle vetorial (BARBOSA et al., 2015). Em 1991, a iniciativa dos países do Cone Sul-Americano para eliminação do vetor domiciliado *Triatoma infestans*, levou a uma redução de 94% na incidência da doença de Chagas nesses países (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012).

Entretanto, a doença de Chagas continua representando um importante problema de saúde pública no Brasil (COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018). No período de 2007 a 2019, foram confirmados 3.060 casos agudos da doença no país, a maioria nos estados do Pará, Amapá e Amazonas (MS-SVS 2020).

Segundo o Ministério da Saúde, observa-se uma tendência de aumento do número de casos da doença de Chagas na região Norte dado à frequência de surtos por transmissão via oral (MS-SVS 2020). Em 2018, foram registrados 380 casos agudos da doença no Brasil. Destes, 92,1% ocorreram na região Norte onde a incidência da doença atinge 1,93 casos/1000 habitantes (MS-SVS 2019).

A manutenção desse quadro está relacionada à ocorrência dos eventos de transmissão intermediados por triatomíneos silvestres tanto em áreas domiciliares e peridomiciliares quanto na forma de surtos por transmissão oral do *T. cruzi* (COURA; JUNQUEIRA, 2015). Observa-se ainda, a transmissão vetorial extradomiciliar em que ocorre, acidentalmente, exposição ao ciclo silvestre do *T. cruzi* (MS-SVS 2020).

O estado do Pará é, atualmente, o mais afetado pela doença. Dos 380 casos registrados no país em 2018 pelo Ministério da Saúde, 76,3% eram residentes no referido estado (MS-SVS 2019). Foram, ainda, registrados no período de 2002 a 2016, mais de 2.000 casos confirmados em 81 municípios (SANTOS et al., 2018). O mecanismo de transmissão mais prevalente foi pela via oral contabilizando aproximadamente 73% dos casos, seguido da via vetorial em aproximadamente 25% dos casos (Figura 2) (SANTOS et al., 2018).



**Figura 2.** Distribuição de casos agudos da doença de Chagas de acordo com a via de transmissão e mortes no período de 2002 a 2016, no estado do Pará. Adaptado de Santos et al. (2018).

No estado do Amazonas, segundo o Ministério da Saúde, foram registrados um total de 66 casos agudos da doença de Chagas entre 2014 e 2019 (MS-SVS 2020). Já no período de 1980 a 2013, foram registrados 111 casos agudos da doença distribuídos entre 19 dos 62 municípios (BARBOSA et al., 2015). Em anos recentes, observou-se um aumento pronunciado do número de casos que podem estar relacionados a uma série de fatores. Entre eles, o contato de populações humanas com triatomíneos silvestres isolados ou ligados a surtos agudos por transmissão via oral (BARBOSA et al., 2015).

## 2.3 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Observa-se que, em décadas recentes, houve uma mudança nos padrões epidemiológicos de transmissão da doença de Chagas no Brasil (DIAS et al., 2016). Mecanismos de transmissão ainda mal caracterizados presentes na região amazônica passaram a ter importância como principais vias de transmissão de *T. cruzi* às populações humanas (DIAS et al., 2016).

Entre os principais fatores de risco associados à transmissão na região amazônica destacam-se: Grande número de espécies de mamíferos reservatórios do *T. cruzi*, a ocorrência de mais de 20 espécies de triatomíneos na região, ocorrência de surtos agudos por transmissão via oral, intenso processo de deflorestamento e aumento da migração de populações provenientes de áreas endêmicas (BARBOSA et al., 2015, COURA 2015).

Nesse contexto, observa-se também, a pobreza das populações inseridas nessas áreas caracterizadas pelas más condições de moradia e pouco acesso à saúde, fatores determinantes para a transmissão do *T. cruzi* (DIAS et al., 2016).

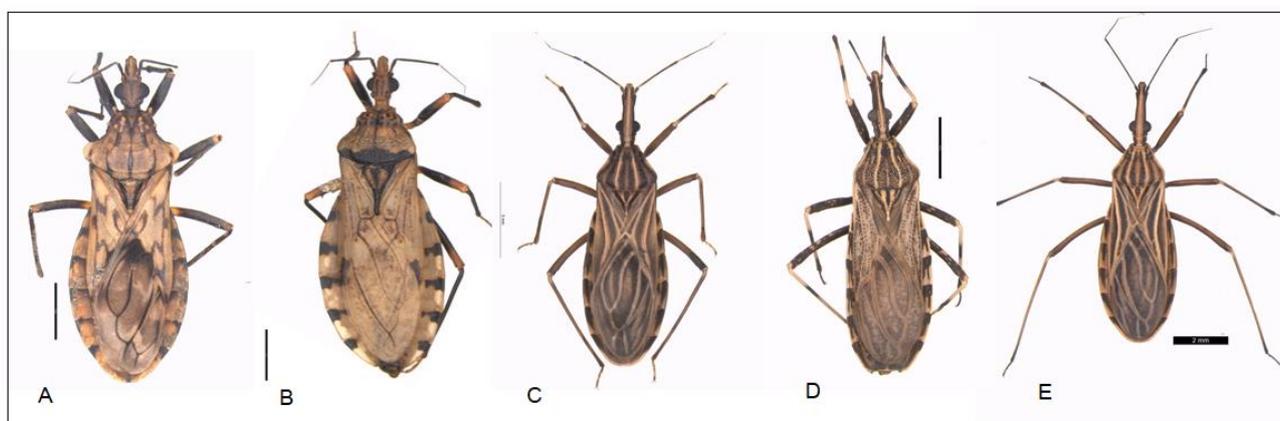
### 2.3.1 Transmissão vetorial

Atualmente, a transmissão vetorial em caráter endêmico do *T. cruzi* na Amazônia brasileira se dá por mecanismos ainda mal caracterizados, entre eles: Via vetorial domiciliar sem colonização e via vetorial extradomiciliar (DIAS et al., 2016).

Após a interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo vetor domiciliado *Triatoma infestans* pela iniciativa dos países do Cone Sul-americano, vetores silvestres autóctones são responsáveis por eventos de invasão de domicílios representando riscos para a transmissão ativa (WALECKX et al. 2015).

Na Amazônia, estão presentes mais de 20 espécies de triatomíneos autóctones distribuídos entre os gêneros *Belminus*, *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (COURA; JUNQUEIRA, 2012, CASTRO et al. 2018). Entre elas, sete espécies oferecem maior risco a população humana dados suas altas taxas de infecção com *T. cruzi*, sendo eles *Rhodnius pictipes* (Figura 3D), *R. montenegrensis* (Figura 3E); *R. stali*, *R. robustus* (Figura 3C), *Panstrongylus geniculatus* (Figura 3B), *P. lignarius* (Figura 3A) e *Triatoma maculata* (COURA, 2015).

Podem ser observadas na tabela 1 as espécies ocorrentes na região amazônica que foram encontradas infectadas pelo *T. cruzi*.



**Figura 3.** Algumas espécies de triatomíneos silvestres autóctones na região da Amazônia brasileira.

(A) *Panstrongylus lignarius*; (B) *Panstrongylus geniculatus*; (C) *Rhodnius robustus*; (D) *Rhodnius pictipes*; (E) *Rhodnius montenegrensis*.

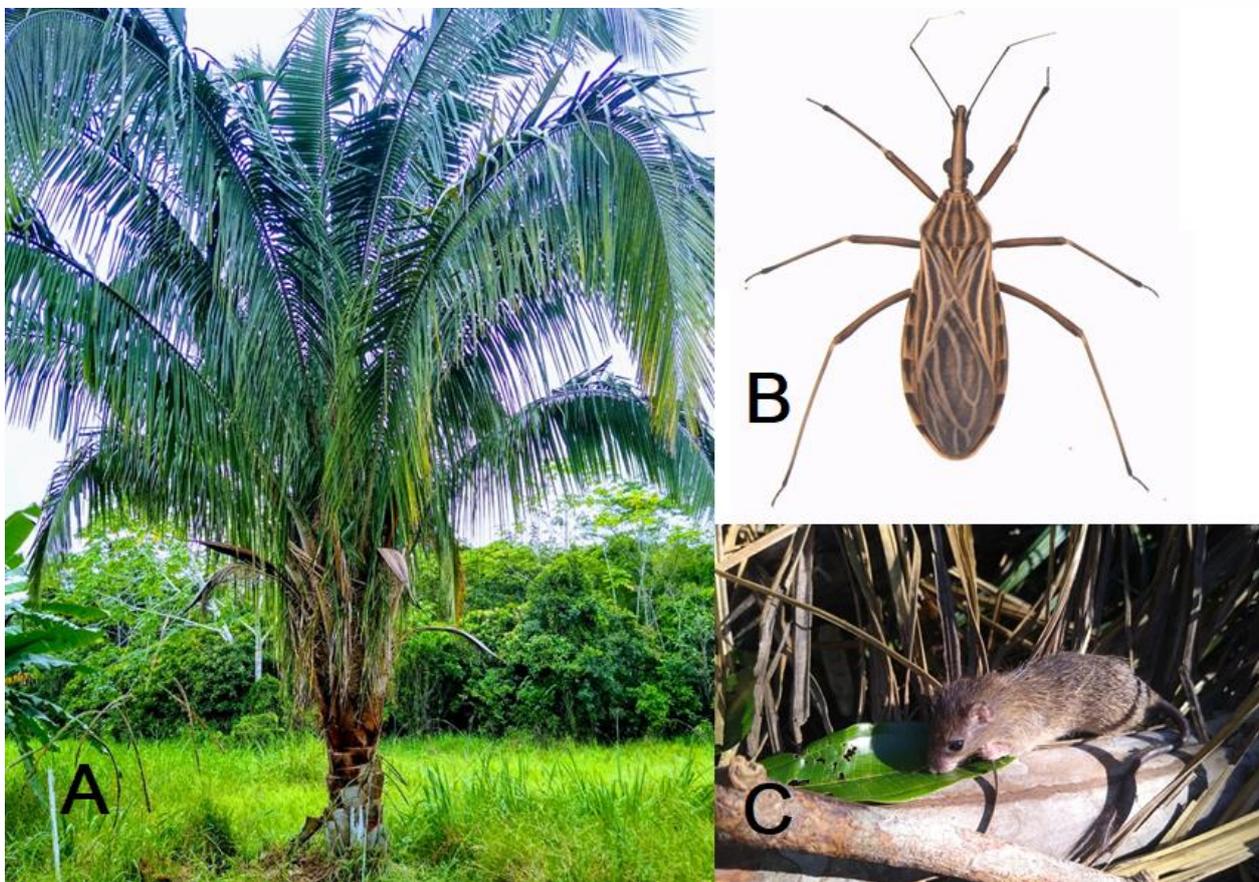
**Tabela 1.** Triatomíneos ocorrentes na Amazônia brasileira encontrados infectados com o *Trypanosoma cruzi*.

| Espécies encontradas infectadas: | Fonte:                                    |
|----------------------------------|---|
| <i>Rhodnius robustus</i>         | PÓVOA et al., 1984, BRAZIL 1985.          |
| <i>Rhodnius brethesi</i>         | MASCARENHAS, 1991.                        |
| <i>Rhodnius pictipes</i>         | LAINSON et al., 1979, PÓVOA et al., 1984. |
| <i>Rhodnius montenegrensis</i>   | BILHEIRO et al., 2018.                    |
| <i>Rhodnius neglectus</i>        | BRAZIL 1985.                              |
| <i>Rhodnius paraenses</i>        | MILES et al., 1981.                       |
| <i>Panstrongylus geniculatus</i> | BARRET; GUERREIRO, 1991.                  |
| <i>Panstrongylus lignarius</i>   | MILES et al., 1981.                       |
| <i>Eratyrus mucronatus</i>       | MILES et al. 1981.                        |

Adaptado de Coura e Junqueira (2012).

Há registro, ainda, de 38 espécies de mamíferos reservatórios do *T. cruzi* distribuídos entre as ordens Marsupialia, Chiroptera, Rodentia, Edentada (Xenarthra), Carnivora e Primata (CASTRO et al., 2018).

Entre as espécies de triatomíneos presentes na Amazônia brasileira, destacam-se aquelas pertencentes ao gênero *Rhodnius* (Figura 4B), encontrados frequentemente associados a palmáceas do gênero *Attalea* (Figura 4A) (ABAD-FRANCH et al., 2010). Esses insetos têm sido incriminados nos eventos de transmissão domiciliar sem colonização em que insetos adultos, possivelmente atraídos por fontes luminosas, invadem domicílios rurais e urbanos (BARBOSA et al., 2015, DIAS et al., 2016).



**Figura 4.** (A) *Attalea* sp., comumente encontrada na região amazônica, oferece abrigo para as colônias de triatomíneos vetores e mamíferos reservatórios do *T. cruzi*; (B) Espécime de triatomíneo da espécie *Rhodnius montenegrensis*; (C) Pequeno roedor (*Oryzomys* spp.) reservatório do *T. cruzi* na região amazônica.

A presença de palmáceas no peridomicílio é um fator chave para os eventos de invasão domiciliar e, é considerado fator de risco para a transmissão vetorial (ABAD-

FRANCH et al., 2010). Segundo estudos anteriores, a ação antrópica em áreas preservadas, frequentemente observada na região amazônica, aumenta a proliferação dessas palmáceas (ABAD-FRANCH et al., 2015).

Os triatomíneos do gênero *Rhodnius*, dado à sua associação a palmáceas, são, também, incriminados nos eventos de transmissão vetorial extradomiciliar (COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018). Essa via de transmissão se dá pela aproximação de populações humana aos ecótopos dos triatomíneos em áreas de mata preservada (COURA; JUNQUEIRA, 2012).

Esse mecanismo de transmissão tem sido observado entre coletores de piaçava no alto do Rio Negro, Amazonas, e outras atividades extrativistas comuns na região amazônica (COURA; JUNQUEIRA; FERREIRA, 2018). Nesse caso, a doença de Chagas se tornou uma doença ocupacional, acometendo especificamente trabalhadores envolvidos nessas atividades (COURA 2015).

### 2.3.2 Transmissão oral

A transmissão oral através da predação é provavelmente o principal mecanismo de transmissão entre animais silvestres dado que mamíferos frequentemente se alimentam de insetos incluindo triatomíneos potencialmente infectados (COURA 2015).

Com relação à transmissão do *T. cruzi* para a população humana, a via de transmissão oral é responsável pela maior parte dos casos agudos registrados na Amazônia em surtos de contextos familiares ou multifamiliares (DIAS et al., 2016). Estes surtos agudos, causados pelo consumo de gêneros alimentícios infectados pelo *T. cruzi*, representam, atualmente, 70% dos casos registrados em todo o país (BARBOSA et al., 2015, SANTOS et al., 2020).

A maioria dos eventos de transmissão oral tem sido associada ao consumo de polpas de frutas como açaí, bacaba, jaci (coquinho) e caldo de cana (DIAS et al., 2016). Além disso, o consumo de carne mal cozida de animais silvestres como capivaras, tatus e gambás também podem ser relacionados à transmissão oral do *T. cruzi* principalmente em populações rurais (COURA 2015).

A contaminação desses gêneros alimentícios pode ocorrer pelas fezes e/ou urina de triatomíneos infectados ou pela presença dos próprios insetos triturados durante o processamento, muitas vezes rudimentar, das polpas de frutas (Figura 5). Pode ainda

ocorrer contaminação de frutos pela secreção de glândulas de cheiro de marsupiais sinantrópicos do gênero *Didelphis* infectados (COURA; JUNQUEIRA, 2012).



**Figura 5.** Processamento do açai em comunidade rural no interior do Amazonas.

De um modo geral, em casos da doença transmitidos oralmente, esta apresenta um quadro agudo mais severo em que a letalidade chega a mais de 5% na Amazônia (FERREIRA et al., 2018). Isso se deve, provavelmente, a um maior inóculo do *T. cruzi* recebido nos eventos de transmissão oral juntamente a capacidade do parasito em sobreviver ao pH ácido do estômago, penetrando ativamente pela mucosa gástrica atingindo a circulação sanguínea (YOSHIDA 2009; COURA 2015).

Nesses casos, observa-se já em fase aguda quadros de miocardite e anormalidades no eletrocardiograma além de outros sintomas menos específicos como febre, mialgia, edemas e dores abdominais (COURA 2015).

## 2.4 PERSPECTIVAS DE CONTROLE

Até o presente momento, o controle da doença de Chagas tem se baseado no tratamento de pacientes infectados bem como na prevenção dos eventos de transmissão por meio de estratégias de controle vetorial (WALECKX et al., 2015).

As iniciativas de controle vetorial na década de 90 reduziram a prevalência da doença de Chagas de cerca de 18 milhões de infectados para oito milhões, tendo se demonstrado, portanto, eficazes para a redução dos eventos de transmissão (WHO, 2014).

Entretanto, os eventos de invasão de domicílios por triatomíneos silvestres limita a efetividade dos programas de controle vetorial baseados em inseticidas residuais (ALMEIDA et al. 2009, GUHL et al. 2009, GRIJALVA et al. 2012). Essa limitação se dá pela reinfestação de residências previamente tratadas por espécies intrusivas que invadem e não colonizam o domicílio (SILVA et al., 2012)

Assim, para que as estratégias de controle vetorial sejam eficazes nesse cenário, o controle dos processos de reinfestação deve ser baseado em ações continuadas e sustentadas que combinem diferentes estratégias (GRIJALVA et al. 2012).

Outro desafio no controle da doença de Chagas na Amazônia é o aumento do número de casos agudos pela via de transmissão oral, ocorrendo majoritariamente pelo consumo de polpa de açaí contaminada. Assim, estratégias que possam eliminar patógenos durante o processamento da fruta podem reduzir a incidência de casos agudos por essa via de transmissão (VASCONCELOS; MELO FILHO, 2010).

O processo de pasteurização, que consiste em submeter um produto a tratamento térmico de alta temperatura e, em seguida, à baixa temperatura é capaz de destruir células vegetativas de microorganismos patogênicos termossensíveis (VASCONCELOS; MELO FILHO, 2010). Para o processamento do açaí, recomenda-se que os produtores utilizem temperaturas entre 80°C a 85°C, por 10 segundos, seguido de resfriamento e congelamento do produto (EMBRAPA 2005).

Alternativamente, o processo de branqueamento comumente utilizados em hortaliças e frutas, pode ser uma estratégia de baixo custo acessível a pequenos produtores (EMBRAPA 2005). Esse processo consiste em mergulhar os alimentos em água, à temperatura pré-determinada, superaquecida ou vapor fluente (VASCONCELOS; MELO FILHO, 2010).

Para o açaí, o Ministério da Saúde determina que os pequenos produtores utilizem a técnica de branqueamento juntamente à higienização do fruto por imersão em solução de

hipoclorito 2,5% (ROGEZ; AGUIAR, 2012). Essas técnicas, juntamente às boas práticas de manipulação, colheita e transporte, podem reduzir ou até mesmo evitar a contaminação da polpa do açaí pelo *T. cruzi* (ROGES; AGUIAR, 2012).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se que, em décadas recentes, houve um aumento do número de casos agudos da doença de Chagas na região da Amazônia brasileira. Esse quadro se deve à ocorrência dos eventos de transmissão ativa intermediados por triatomíneos silvestres por meio de mecanismos mal caracterizados.

Destacam-se as vias de transmissão domiciliar sem colonização, via de transmissão extradomiciliar e via oral a partir da ingestão de gêneros alimentícios contaminados com fezes/urina de triatomíneos infectados.

Entre os fatores de risco associados à manutenção desse quadro estão migrações humanas provenientes de áreas endêmicas, a crescente degradação ambiental e a precariedade de condições socioeconômicas como habitação, educação, saneamento e renda.

Assim, há a necessidade de um maior conhecimento quanto aos distintos cenários epidemiológicos presentes na região amazônica bem como quanto às dinâmicas de transmissão.

Desse modo, a vigilância em saúde continuada e a implantação de programas de prevenção são fundamentais para que haja a efetiva redução da transmissão da doença de Chagas na região amazônica.

### 4. REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; FERRAZ, G.; CAMPOS, C.; PALOMEQUE, F.S.; et al. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: Infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p.e620, 2010.

ABAD-FRANCH, F.; LIMA, M.M.; SARQUIS, O.; GURGEL-GONÇALVES, R.; et al. On palms, bugs and Chagas disease in the Americas. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 126-141, 2015.

ALMEIDA, C.E.; FOLLY-RAMOS, E.; PETERSON, A.T.; LIMA-NEIVA, V., et al. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? **Medical Veterinary Entomology**, v. 23, n. 1, p. 410–417, 2009.

BARBOSA, M.G.V.; FERREIRA, J.M.B.B.; ARCANJO, A.R.L.; SANTANA, R.A.G.; et al. Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 23-33, 2015.

BARRET, T.V.; GUERREIRO, J.C.H. Os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) em relação à doença de Chagas na Amazônia. In VAL, A.L.; FIGLUOLO, R.; FELDBERG, E. **Bases Científicas para Estratégia de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas**, 1<sup>a</sup> ed. Inpa, Manaus, 1991.

BILHEIRO, A. B.; ROSA, J. A.; OLIVEIRA, J.; BELINTANI, T.; FONTES, G.; MEDEIROS, J.F.; MENEGUETTI, D.U.O.; CAMARGO, L.M.A. First Report of Natural Infection with *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 1, p. 605–610, 2018.

BRAZIL, R.P.; SILVA, A.R.; ALBARELLI, A.; VALE, J.F. Distribuição e infecção de triatomíneos por *Trypanosoma* do tipo *cruzi* na Ilha de São Luis, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 1, p. 257-260, 1985.

CASTRO, M.A.L.R.; CASTRO, G.V.S.; SOUZA, J.L.; SOUZA, C.R.; RAMOS, L.J.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J.A.; CAMARGO, L.M.A.; MENEGUETTI, DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA. First report of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Rondônia, Amazon, Brazil. **Acta Tropica**, v. 182, n. 1, p. 158-160, 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. Sp. Agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 1, p. 159-218, 1909.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 145-154, 2012.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon, **Acta Tropica**, v.151, p.51-57, 2015.

COURA, J. R. The main scenarios of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n. 1, p. 1-6, 2015.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERREIRA, J.M.B.B. Surveillance of seroepidemiology and morbidity of Chagas disease in the Negro River, Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 17-23, 2018.

DIAS, J.C.P.; RAMOS JÚNIOR, A.N.; GONTIJO, E.D.; LUQUETTI, A.; et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 49, n. 1, p. 3-60, 2016.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema de produção do açaí**. 2005. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/)>, acessado em 20/03/2020.

FERREIRA, R.T.B.; CABRAL, M.L.; MARTINS, R.S.; ARAÚJO, P.F. et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açaí products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n.233, p. 1-12, 2018.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, n. 1, p.1-36, 2003.

GALVÃO, C.; JUSTI, S.A. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 116-125, 2015.

GUHL, F.; PINTO, N.; AGUILERA, G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p.71-75, 2009.

GRIJALVA, M.J.; SUAREZ-DAVALOS, A.; VILLACIS, A.G.; OCAÑA-MAYORGA, S.; et al. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuatorensis* populations in southern Ecuador. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 17-25, 2012.

GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A.T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 1-16, 2012.

JANSEN, A.M.; LEON, L.; MACHADO, G.M.; DA SILVA, M.H.; SOUZA-LEÃO, S;M.; DEANE, M.P. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: parasitological and serological follow-up of the acute infection. **Exp Parasitol**, v. 73, n.3, p. 249-259, 1991.

JUNQUEIRA, A.C.V.; GONÇALVES, T.C.M.; MOREIRA, C.J.C. **Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, v. 16 n. 1, p. 381-387, 2000.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; FRAHIA, H.; MILES, M.A.; DRAPER, C.C. Chagas' disease in the Amazon Basin. I. *Trypanosoma cruzi* in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 193-204, 1979.

LANA, M.; TAFURI, W.L.; BARTHOLOMEU, D.C. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas In NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13ª ed. Atheneu, São Paulo, p. 91-124. 2016.

MASCARENHAS, B.M. Triatomíneos da Amazônia sobre o ciclo evolutivo do *Rhodnius brethesi*. Matta, 1919 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). **Boletim do Museu Emilio Goeldi**, v.6, p. 191-202, 1990.

MASSARO, D.C.; REZENDE, D.S.; CAMARGO, L.M.A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 2, p. 228-240, 2008.

MEIS, J.; CASTRO, R.S.S. **Manual para Diagnóstico em Doença de Chagas para Microscopistas de Base do Estado do Pará**. 1ª ed. FioCruz, Rio de Janeiro, 2017.

MILES, M.A.; SOUZA, A.A.; PÓVOA, M. Chagas' disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 1, p. 266-278, 1981.

MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016**. 1ª ed. Brasília: MS/SVS, 2019.

MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas, 14 de abril – Dia Mundial**. 1ª ed. Brasília: MS/SVS, 2020.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 1, p. 82-94, 2018.

PÓVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; NAIFF, R.D.; ARIAS, J.R.; et al. Chagas disease in Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazon and Rondônia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 479-487, 1984.

REZENDE, A.V. Importância das Matas de Galeria: Manutenção e recuperação. In: RIBEIRO, J.F. **Cerrado: Matas de Galeria**. EMBRAPA, Planaltina, 1998.

ROGEZ, H.; AGUIAR, F.S. Contaminação da bebida açaí envolvendo *Trypanosoma cruzi*. In: Pessoa JDC, Teixeira GHA. (Org.). **Tecnologias para inovação das cadeias Euterpe**. 1ª ed. Brasília: Embrapa, 2012.

SANTOS, V.R.C.; MEIS, J.; SAVINO, W.; ANDRADE, J.A.A.; VIEIRA, J.R.S.; COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, e170298, 2018.

SANTOS, V.R.C.; ANTUNES, D.; SOUZA, D.S.M.; MOREIRA, O.C.; LIMA, I.C.A.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; LOBO, J.P.; MEIS, E.; COURA, J.R.; SAVINO, W.; JUNQUEIRA, A.C.V.; MEIS, J. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, e190364, 2020.

SILVA, M.B.A.; BARRETO, A.V.M.S.; SILVA, H.A.; GALVÃO C.; et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the State of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 60-65, 2012.

TOSO, M.A.; VIAL, U.F.; GALANTI, N. Transmisión de la Enfermedad de Chagas por vía oral. **Revista Médica de Chile**, v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011.

VASCONCELOS, M.A.S.; MELO FILHO, A.B. **Técnico em Alimentos. Conservação de Alimentos**. 1ª ed. Recife: EDUFRPE, 2010.

VIGLIANO, C.A.; CHAO, C.; LEONE, J.L. Chagas disease: Historical perspective. **Molecular Basis of Disease**, v.1866, n.5, p.e165689, 2020.

WALECKX, E.; GOURBIÈRE, S.; DUMONTEIL, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 324-338, 2015.

WHO - World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v.90, n.6, p.33-43, 2014.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n1, p. 101-107, 2009.

## LEISHMANIOSES COMO DOENÇAS NEGLIGENCIADAS: UM PANORAMA COMPLEXO

Anna Fernandes Silva Chagas do Nascimento<sup>1</sup>, Dilvani Oliveira Santos<sup>2</sup>

1. Universidade Federal Fluminense (UFF), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA), Niterói - Rio de Janeiro, Brasil;

2. Universidade Federal Fluminense (UFF), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA), Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI), Niterói - Rio de Janeiro, Brasil.

### RESUMO

As Leishmanioses são doenças negligenciadas causadas pelo protozoário *Leishmania* sp. São protozooses transmitidas por fêmeas de insetos flebotomíneos. Doenças negligenciadas são aquelas que não despertam muito interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de seu tratamento ou formas alternativas de medicações e, além disso, possuem pouco investimento governamental em pesquisas ou projetos que visem a maior compreensão de seu ciclo epidemiológico, transmissão ou medidas profiláticas. Os indivíduos acometidos, normalmente, são de baixa renda, inseridos em um ambiente de desvalorização social e de saúde pública. Esse capítulo, portanto, tem o objetivo de trazer uma revisão bibliográfica sobre o panorama das Leishmanioses, inseridas no contexto das doenças tropicais negligenciadas.

**Palavras-chave:** Leishmanioses, Saúde coletiva e Doenças tropicais negligenciadas

### ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by the protozoan *Leishmania* sp. They are protozoa transmitted by females of sand fly insects. Neglected diseases are those that do not sparkle a huge level of interest in the pharmaceutical industry for the development of their treatment or alternative forms of medications and, in addition, they have low government investment in both research and projects aimed at a greater understanding of their epidemiological cycle, transmission or prophylactic measures. The affected individuals are usually of low income, inserted in an environment of social and public health devaluation. This chapter, therefore, aims to bring a bibliographic review on the panorama of Leishmaniasis, inserted within the context of tropical neglected diseases.

**Keywords:** Leishmaniasis, Collective health and Tropical neglected diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Saúde, as doenças negligenciadas são aquelas que "prevalencem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade social, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países" (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010). Essas doenças não são exclusivas de países em desenvolvimento, porém despertam pouco atrativo financeiro pela indústria farmacêutica, principalmente por não atingirem o maior mercado consumidor de medicamentos, que são os países desenvolvidos. O livro "O cortiço" de autoria de Aluisio Azevedo, publicado em 1890, já demonstrava, de fato, as condições precárias nas quais o país se encontrava e, como a população vivia sobre situações extremas de pobreza, falta de saneamento básico, má condição nutricional e acesso à moradia e medicamentos inadequados. Com isso, o Rio de Janeiro era conhecido como "túmulo dos imigrantes", graças ao fluxo grande de pessoas vindas de todas as regiões do mundo e sua aglomeração nas periferias do estado, agravando a transmissão de doenças, perpetuando os ciclos de pobreza, desigualdade e exclusão social.

A designação "doenças tropicais" não foi invenção da Organização Mundial da Saúde (OMS), pois já constava do vocabulário médico desde o século XIX (CAMARGO, 2008) e, consolidando a medida que microrganismos eram sendo reconhecidos como causadores de doenças e tinham seus mecanismos de transmissão esclarecidos. Ainda de acordo com esse autor, a expansão colonizadora da Inglaterra, da França e sócios menores, entre os quais os Estados Unidos, expandindo-se para o Caribe e o Pacífico, expôs um mundo novo repleto de supostas riquezas, mas também de doenças desconhecidas ou quase desconhecidas. E, como a maioria das novas colônias se situava nos trópicos, essas doenças curiosas e exóticas foram chamadas de "tropicais" (CAMARGO, 2008).

Vale a pena ressaltar que ainda segundo CAMARGO (2008), existem doenças que, se não fosse pelo "subdesenvolvimento", não mais existiriam e, dessa forma, a OMS as agrupou, todas, como "doenças negligenciadas". A Boubá (yaws, do inglês) são treponematoses da pele e, como a própria sífilis, são facilmente tratáveis com penicilina, apenas ainda existem porque as populações afetadas não têm acesso aos serviços de saúde. A úlcera de Buruli, rara ou não diagnosticada no Novo Mundo, é causada por uma micobactéria que provoca extensas lesões cutâneas geralmente dos membros inferiores em

populações ribeirinhas ou de áreas alagadiças. O tracoma, infecção clamidial ocular, que eventualmente, ocorre também no Brasil, vitimizou até 2008, 80 milhões de pobres, dos quais seis milhões ficaram cegos. As verminoses intestinais, menos alarmantes, são ainda bastante prevalentes em países em desenvolvimento ao lado do cólera e das genéricas diarreias infantis (dentre elas, as virais). Dessa forma, todas essas doenças poderiam ser chamadas de tropicais ou de doenças do “subdesenvolvimento”, mas o nome de “doenças negligenciadas” adotado pela OMS abrange todas elas, sem sinalizar os trópicos, como fator causal. O que segundo, Camargo (2008) foi muito mais apropriado.

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, protozoários intracelulares do ser humano e de animais domésticos e silvestres. As leishmanioses cutâneas são muito frequentes na Amazônia. As demais leishmanioses, incidem não somente na região tropical, mas também um pouco mais ao norte, incluindo países mediterrâneos. Dessa forma, não mereceriam a qualificação de “tropicais” nem de doenças de populações marginalizadas, pois ocorrem em muitas regiões do mundo desenvolvido como a Península Ibérica e a Itália, a Grécia e a Turquia. A mais grave das leishmanioses, a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, descrita, pela primeira vez, na Índia, mas presente também na África e na América Latina, é doença de difícil diagnóstico e, quando não tratada, pode ser mortal (SHAW, 2007; CAMARGO, 2008).

Atualmente, as leishmanioses ainda permanecem um grande problema de saúde pública em muitos países endêmicos e, em especial a LV. O número total anual de casos relatados de LV, nos 14 países com alto índice da LV (Brasil, China, Etiópia, Geórgia, Índia, Quênia, Nepal, Paraguai, Somália, Sudão do Sul, Espanha, Sudão e Uganda) caiu de 60.000 em 2006 para 30.000 em 2014. Essa queda nos números deve-se, principalmente, a uma queda de 5 vezes de declínio nos casos de LV na Índia. Por outro lado, o número total de casos relatados anualmente nos 12 países com alta incidência (Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Marrocos, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, Síria, Tunísia e Turquia) permaneceram inalterados, no alto nível de cerca de 150.000. O aumento do número de casos de leishmanioses observados nos últimos 25 anos em todo o mundo, conforme revisado por Steverding (2017) é devido a vários fatores e, todos, consequentes a Globalização e mudança climática. Nas últimas décadas, o número de casos de leishmanioses em viajantes internacionais (turistas e empresários) tem aumentado. O recente surto de LV nas zonas de conflito do Oriente Médio indica que guerra, desastres ecológicos e migração forçada são, lamentavelmente, novos fatores associados as epidemias de leishmanioses (STEVERDING, 2017).

Conforme acima mencionado, as doenças negligenciadas não apresentam interesse na pesquisa pelas indústrias farmacêuticas, com isso há ainda uma grande dependência tecnológica do Brasil aos países desenvolvidos, fazendo com que seja inviabilizado, ainda mais, a autonomia no investimento de tratamentos alternativos e melhorias nas profilaxias das doenças pertencentes a esse grupo. O conhecimento produzido em pesquisas científicas nessa área não se reverte em avanços terapêuticos, produção de novos fármacos, métodos diagnósticos alternativos e vacinas. Isto ocorre, pois, o baixo lucro fornecido pelo investimento dessas doenças faz com que haja perda do interesse da indústria em investir na continuidade de suas pesquisas. Conseqüentemente, estes medicamentos tornam-se defasados e, na maior parte das vezes, de alto custo para quem os consome.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Em 1975, houve o aumento de pesquisas e Programas de treinamento em doenças tropicais, sendo em 1976 formado o Programa integrado de doenças endêmicas. Entretanto, entre o ano de formação do Programa de treinamento e 1999, somente 13 novos fármacos foram aprovados para uso no combate as doenças negligenciadas. Este número preocupante é totalmente oposto à grande produção de fármacos destinados a outras doenças que surgiram no mesmo período. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas são atingidas com uma ou mais doenças negligenciadas, representando pouco mais de um sexto da população mundial (BRASIL, 2010), mesmo assim, o maior investimento financeiro e comercial envolve outra lista de doenças, que acometem outra classe da população.

No ano 2000 a OMS e o programa “Médicos sem fronteiras” separou as doenças nos seguintes grupos: doenças globais, doenças negligenciadas e doenças mais negligenciadas (pertencentes principalmente aos países em desenvolvimento, como o Brasil). Fêz-se em 2001, a divisão no subgrupo das doenças negligenciadas para as doenças tropicais negligenciadas, compostas por: Úlcera de Buruli, Doença de Chagas, Dengue, Fasciolose, Doença do Sono (Human african trypanosomiasis), Leishmanioses,

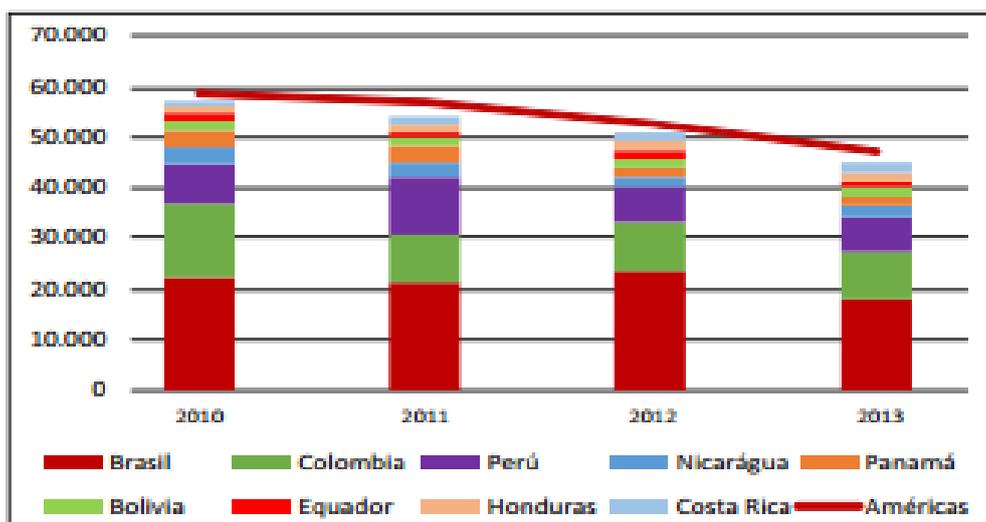
Hanseníase, Dracunculose, Filariose Linfática e, dentre as extremamente negligenciadas, se encontra a Leishmaniose visceral.

As ações do Ministério da Saúde contra esse grupo de doenças deram-se início efetivo em 2003, através do primeiro edital sobre a tuberculose, seguido pelos editais de dengue e hanseníase em 2004 e 2005. Através do levantamento de dados epidemiológicos e estudos sobre o impacto da doença, foram definidas sete prioridades de atuação que compõem, ainda hoje, o programa em doenças negligenciadas. Entre elas estão: Dengue, Doença de Chagas, Leishmanioses, Hanseníase, Malária, Esquistossomose e Tuberculose (BRASIL, 2010), sendo somente as Leishmanioses, Malária e Doença de Chagas responsáveis pela morte de 500 mil a 1 milhão de pessoas por ano. Pode-se observar a presença das Leishmanioses em todas as listas que retratam esse grupo de doenças.

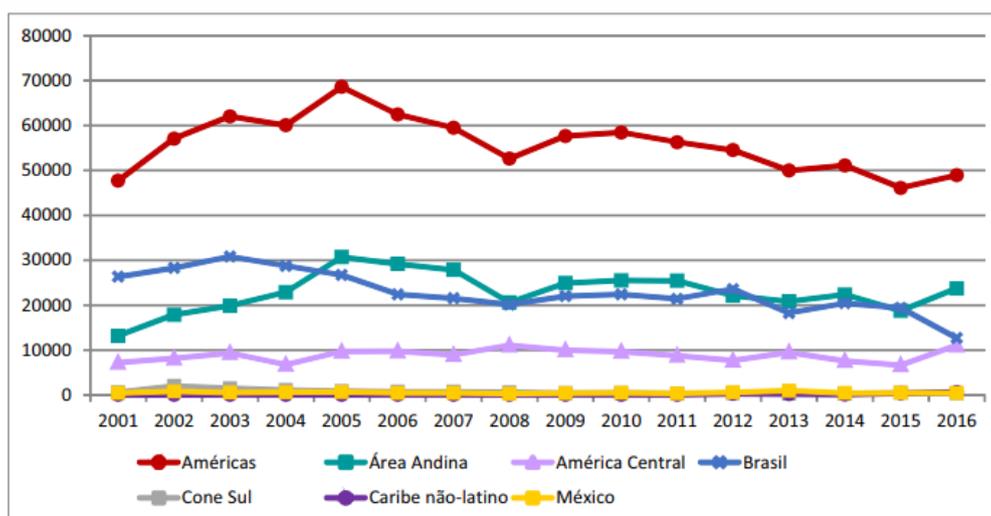
Sabe-se que nos dias atuais, aproximadamente doze (12) milhões de pessoas são infectadas por esse complexo de doenças em 88 países, sendo o Brasil, junto a Índia, Etiópia, Quênia e Sudão como os mais afetados. O Brasil é responsável por 90% dos casos de Leishmanioses na América Latina, sendo todos os estados brasileiros acometidos com a forma cutânea dessa doença (LYRIO et al., 2017). Apesar desses números marcantes, entre o ano de 2010 e 2013 houve uma redução do número de casos ativos (Figuras 1 e 2). Entretanto, essa redução pode ser atribuída a subnotificação dos casos, diagnóstico tardio devido a desorganização do serviço prestado nos postos de saúde, sistema falho de vigilância, falta de preparo de áreas de saúde e falta de campanhas de conscientização da população (OMS, 2015).

Como comprovação da possível subnotificação dos casos, no ano de 2016, foi registrado um aumento de 6,15% com relação ao ano anterior, sendo esse aumento observado nos registros de casos das sub-regiões da América Central (66%) e área Andina (27%) 17 países endêmicos reportaram cerca de 48.915 casos de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Muco-cutânea (Figura 2). Os maiores números de registros foram feitos pelo Brasil (12.690 casos), Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.271) que juntos representaram 74,3% do total de casos na região (LYRIO et al. 2017).

O tratamento ainda é feito com antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha e, a Anfotericina B, como drogas de segunda escolha, tendo a Mitelfosina como o primeiro fármaco oral utilizado para tratamento (BRASIL, 2006; SANTOS et al., 2008; ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; LYRIO et al. 2017).



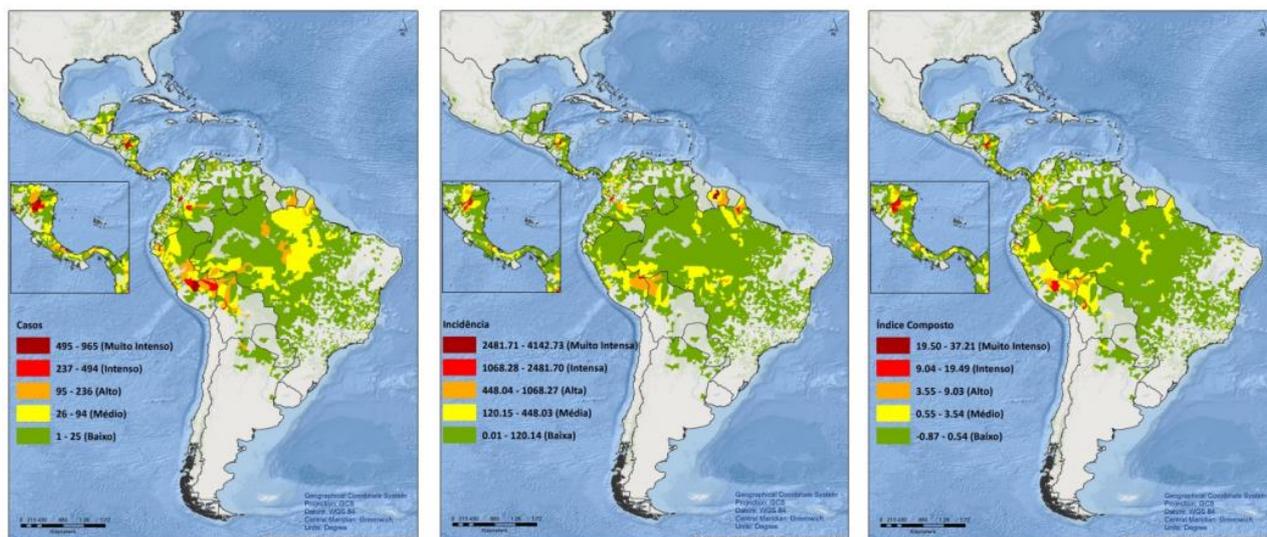
**Figura 1.** Número de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa nos países de maior notificação na América Latina entre os anos de 2010-2013. Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses (OMS, 2015).



**Figura 2.** Número de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa nas sub-regiões e em países selecionados das Américas, 2001-2016. Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância (OPAS, 2018).

Os primeiros casos de Leishmanioses eram destinados aos estados do Norte e Nordeste, dando a essas doenças um caráter sobretudo, rural (Figura 3). Porém, com a constante urbanização e a entrada do ser humano na mata, houve sobreposição do ciclo silvestre e urbano, fazendo com que seja encontrada, atualmente, nos grandes centros urbanos. A maior parte do estudo realizado nessa área de conhecimento envolve a patogênese da doença, poucos deles destinados a seus vetores ou tratamentos alternativos. Isso gera a longo prazo lacunas a serem preenchidas no conhecimento desse

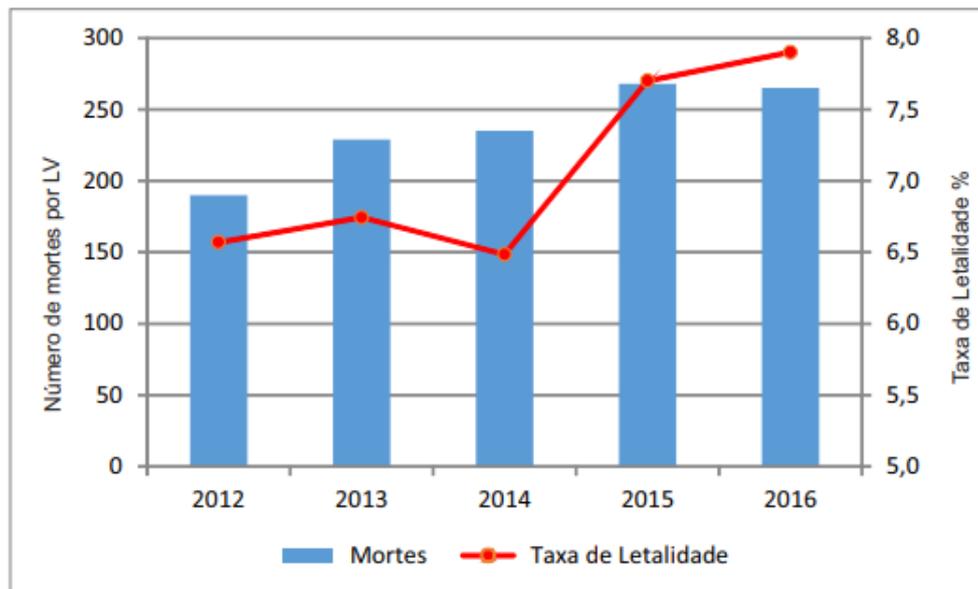
complexo de doenças, tornando ainda maior a dificuldade de seu estudo e total conhecimento (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; WERNECK et al., 2011).



**Figura 3.** Casos, incidência e indicador de Leishmaniose cutânea, classificado de acordo com o risco de transmissão, Américas, 2016.

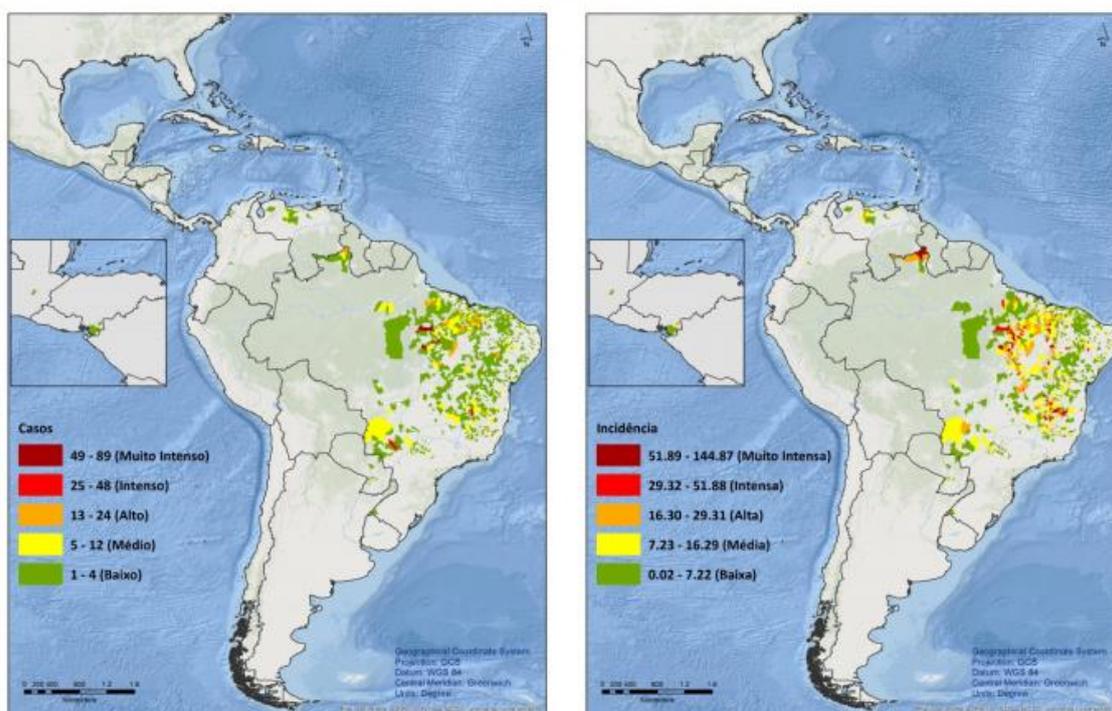
Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância (OPAS, 2018).

A forma visceral da doença é a mais grave e, ainda hoje, causa uma grande porcentagem de morte (Figura 4). Estima-se que 58.000 casos sejam registrados por ano, sendo o Brasil o responsável por 6,36% de morte. Já a forma cutânea, por não causar em sua maioria de casos, o óbito, faz com que os indivíduos acometidos não procurem o tratamento adequado. Muitas vezes os sinais clínicos se confundem com de outras doenças cutâneas e alérgicas, fazendo com que o diagnóstico seja tardio, o tratamento não seja direcionado corretamente e o estudo epidemiológico do caso, equivocado (CALDART et al., 2017). Os casos registrados por ano no mundo são alarmantes, mas é preciso levar em consideração todos aqueles que não foram devidamente notificados ou sequer diagnosticados. O Brasil apresenta nas unidades de saúde, muitas vezes, uma equipe pouco qualificada e treinada para esse tipo de situação, fazendo com que os pacientes sejam constantemente direcionados a diversos outros consultórios ou profissionais até terem definido seu diagnóstico. Durante esse tempo em espera, o indivíduo torna-se uma fonte de infecção para as pessoas, atuando como reservatório e, perpetuando o ciclo de transmissão da doença na região (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Número de mortes e letalidade por Leishmaniose visceral nas Américas entre os anos de 2012 -2016.

Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância (OPAS, 2018).



**Figura 5.** Casos de leishmaniose visceral por segundo nível administrativo, Américas, 2016 e Incidência de leishmaniose visceral por segundo nível administrativo, Américas, 2016, respectivamente.

Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Serviços de Vigilância (OPAS, 2018).

Leishmanioses contribuem para a exclusão social da população acometida, uma vez que, são responsáveis pela redução da produtividade da população trabalhadora, economicamente ativa ou pela condição de aprisionamento dos pacientes que se encontram nas condições mais graves da doença, afastamento das crianças infectadas das escolas, agravando inclusive a escolaridade. A forma mucocutânea por exemplo, é a responsável por causar lesões desfigurantes nos pacientes, muitas vezes sem regressão e, podem evoluir para incapacidades físicas. Por isso, o paciente possui dificuldade de se inserir no ambiente de trabalho e sofre por exclusão social. Apesar do espaço e da importância que essa doença tem recebido, ainda há necessidade de maiores investimentos em seus estudos, visando a maior divulgação em escolas, aumentando a necessidade de investimentos na área de Educação em Saúde, campanhas de vigilância epidemiológica e entomológica, maior divulgação e informação sobre sua transmissão e, continuidade aos estudos de seus tratamentos alternativos (WERNECK et al., 2011). Ainda hoje, as instituições escolares abordam de forma muito básica as doenças negligenciadas, principalmente as Leishmanioses. Com isso, mesmo os alunos escolarizados apresentam dificuldade de entender a importância de seu estudo e, por vezes, desconhecem totalmente o que significado da doença. O ENEM é a principal prova responsável pela inserção do aluno no ensino superior, sendo essa prova feita pelo governo, deveria tecnicamente abordar assuntos pertinentes e atuais do país. Entretanto, nota-se que, muito excepcionalmente, as doenças negligenciadas são mencionadas, sendo raros os casos de quaisquer uma dessas doenças acima serem citadas, afastando ainda mais o aluno da realidade brasileira e destinando o interesse pelo assunto somente do grupo populacional acometido. Sem dúvida, esse tipo de atitude segrega a população, pois afasta os problemas da sociedade rural da sociedade urbana. Mesmo que a doença já não apresente caráter rural somente, a população urbana acometida é constituída por indivíduos de baixa renda.

As doenças negligenciadas, como dito anteriormente, estão inseridas em um contexto social muito importante, onde não somente fatores como o ambiente, espécie do patógeno ou do vetor estão presentes, mas também, as características individuais do paciente. O quadro clínico e a respostas do tratamento podem ser atingidos graças ao estado nutricional e sistema imunológico do indivíduo (CASTELLANO, 2005). Estados e países com uma população sujeita a um estado nutricional prejudicado e vítimas de um saneamento básico inadequado, possuem uma resposta imunológica desprivilegiada às doenças infecciosas de uma forma geral (WERNECK et al., 2011). Sabe-se que existe uma relação direta entre a desnutrição proteica calórica de pacientes e mortes dos mesmos

causadas pela Leishmaniose Visceral, especialmente quando em associação com outras doenças, tais como a Síndrome da Imunodeficiência adquirida causada pelo vírus HIV. Isto é influenciado não somente pelo estado de saúde geral do indivíduo e, pela forma clínica da doença como também pelo agravamento do quadro clínico devido a ação do parasito em aumentar um quadro de desnutrição pré-existente (MALAFAIA et al., 2010). Por isso, torna-se evidente a importância de campanhas de conscientização sobre as Leishmanioses nas áreas onde esses quadros de desnutrição são mais acentuados. O avanço da Leishmaniose Visceral (LV), por exemplo, está diretamente relacionado à desnutrição. Pessoas mal - nutridas apresentam quadros mais graves da doença. Crianças com LV, hospitalizadas, que receberam no ambiente hospitalar uma alimentação nutricional adequada, apresentaram uma melhora dos sintomas, mesmo sem tratamento medicamentoso (ressalta-se aqui a dificuldade de tratamento das Leishmanioses em crianças, devido à alta toxicidade dos fármacos vigentes).

Devido ao aumento geral de ocorrência de Leishmanioses em alguns países, principalmente o Brasil, essas doenças têm sido foco de muito interesse em pesquisa científica nas últimas décadas. A literatura relata epidemias recentes em áreas endêmicas, com evidências de disseminação das leishmanioses em áreas previamente não endêmicas (ANVERSA et al. 2018). Esses autores relatam que, esse binômio epidemia x endemia nas Leishmanioses são parcialmente justificados pelo avanço no diagnóstico e notificação de casos, mas também podem ser devidos ao aumento da migração populacional, aumento da detecção de leishmanioses associada à ocorrência de infecções oportunistas e à resistência aos fármacos utilizados no tratamento, bem como pela adaptação dos ciclos de transmissão a ambientes peri-domiciliares devido à urbanização e desmatamento (ANVERSA et al., 2018). Ainda de acordo com esses autores, no Brasil, casos autóctones de Leishmaniose cutânea já foram relatados em todos os estados e casos de Leishmaniose Visceral foram registrados em 21 dos estados, com aproximadamente 1.600 cidades mostrando transmissão autóctone. Um fato curioso é que a ocorrência de leishmaniose visceral está em grande queda em todo o mundo.

Leishmaniose visceral, ou calazar, é uma doença transmitida pelo mosquito-palha ou birigui (*Lutzomyia longipalpis*) que, ao picar, introduz na circulação do hospedeiro o protozoário *Leishmania chagasi*. A doença é sistêmica e se dissemina no interior dos órgãos, principalmente fígado, baço e medula óssea. A doença não é contagiosa nem se transmite diretamente de uma pessoa para outra, nem de um animal para outro, nem dos animais para as pessoas. A transmissão do parasita ocorre apenas através da picada do

inseto flebotomíneo fêmea infectado. No Brasil, no entanto, há aumento do número de casos. E, isso, provavelmente, se deve ao fato de que na Índia, um dos animais reservatórios de *Leishmania* é a raposa, enquanto, no Brasil, é o cão, um animal doméstico. A China controlou, com sucesso, a infecção de leishmaniose canina (CAMARGO, 2008). Nos cães, o tratamento da leishmaniose visceral existente hoje não é tão eficiente. A miltefosina, droga mais utilizada, não cura a doença, apenas diminui a parasitemia, tornando menor o risco de infecção do flebotomíneo. Existe uma vacina para leishmaniose, mas ela não confere 100% de proteção. No entanto, o Ministério da Saúde investiu na compra de coleiras para uso em cães, impregnadas com inseticida. Embora o Ministério da Saúde discuta a adoção da coleira como medida de controle da LV, a população se depara com os custos desse material de proteção da saúde. É importante mencionar que para comprar as coleiras em grande quantidade e, assim, reduzir seu preço, é necessário haver um consenso federal, estadual e municipal.

De acordo com a revisão reportada por Silveira et al. (2016), nas duas últimas décadas, o processo de expansão da LV se intensificou devido a algumas razões específicas: (1) fatores ambiental (desflorestamento); (2) fatores socioeconômico e, (3) ocupação desordenada na periferia das cidades, que em conjunto, levaram a presença do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) no peridomicílio humano, e do cão doméstico altamente suscetível à infecção, facilitando a disseminação ad LV. Segundo esses autores, de forma preocupante, atualmente, a LV já ocorre na Região Metropolitana de Belém (ilha de Cotijuba), capital do Pará. Ainda segundo SILVEIRA et al. (2016), é importante ressaltar que, mesmo que já estivesse disponível uma vacina para proteger o hospedeiro vertebrado contra a LV, não seria possível assegurar o controle efetivo da doença, uma vez que, para esse fim, haveria necessidade de um conjunto de ações públicas nos diferentes níveis, federal, estadual e municipal, as quais, juntamente com uma vacina eficaz, poderiam exercer um controle seguro da LV.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leishmanioses são as doenças mais negligenciadas do mundo. Isso ocorre porque ela atinge principalmente os países em desenvolvimento, e quem produz os medicamentos e vacinas são os grandes laboratórios privados, que investem menos onde

há menos retorno financeiro. Lamentavelmente, o Brasil é o país com mais doenças negligenciadas no mundo.

Poucos fármacos presentes no mercado são destinados as doenças tropicais negligenciadas. No caso específico das Leishmanioses, seu tratamento é distribuído gratuitamente para a população, pelo Ministério da Saúde, porém, além de ser o mesmo tratamento utilizado há mais de 60 anos, eles apresentam alta toxicidade, difícil administração e casos de resistência, principalmente devido ao número de pacientes que abandonam esse tratamento devido aos efeitos deletérios dos mesmos.

A persistência dessas doenças é, em parte, consequente aos seguintes fatores: divulgação insuficiente do conhecimento sobre as doenças e seus respectivos ciclos epidemiológicos; pouco interesse governamental no investimento de pesquisas sobre as doenças pertencentes a esse grupo; e, adiciona-se o fato dos medicamentos tradicionais para tratamento dessas patologias serem de alto custo e dotados de efeitos indesejáveis. Portanto, as doenças tropicais negligenciadas e, em especial as Leishmanioses, representam um grande problema de saúde pública, principalmente no Brasil (país endêmico para ambas as formas – Leishmaniose cutânea e Visceral), um desafio constante, cuja solução parece estar longe de ser alcançada.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M.G.S.; PEREIRA, V.B.R.; RAMIREZ, L.E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev Associação Médica Brasileira**, v.64, n.3, p.281-289, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Diagnósticos Clínico e Diferencial. Brasília - DF. **Ministério da Saúde**. 138, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev Saúde Pública**, v.44, n. 1, p. 200-2, 2010
- CAMARGO, E., P. Doenças tropicais. **Estudos Avançados**, v.22, n.64, p.95-110, 2008.
- CASTELLANO, L. R. C. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **Vit. Centro de Análisis de Imágenes Biomédicas Computarizadas**, v.25, n.21, p.2-35, 2005.
- Academia Brasileira de Ciências. **Doenças negligenciadas**, Rio de Janeiro, 2010.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Informe Epidemiológico das Américas**, v.2, n.1, p.3- 16, 2015.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas, Leishmanioses**. Número 6, 2018.

- LYRIO, E.; et al. Leishmanioses – biodiversidade dos agentes etiológicos, tratamento espécie-específico e distribuição geográfica. **Editora PerSe**, 1ª. Edição , São Paulo, 2017.
- MALAFAIA, G. Leishmaniose visceral e desnutrição: uma relação ainda muito negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira Med Trop**, v.43, n.4, p.478-479, 2010.
- SANTOS, D. O.; et al. Leishmaniasis Treatment - A Challenge that Remains: A Review. **Parasitology Research**, v. 103 n.1, p.1, 2008.
- SANTOS, F. L. A.; LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; SILVA, K. E. R. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**, v.33, n.1, p.37-44, 2012.
- SHAW, J. 2007. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.5, p.541-547, 2007.
- SILVEIRA, F.T.; LIMA, L.V.R.; SANTOS, T. V.; RAMOS, P.K.S.; CAMPOS, M.B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.7, p.15-22, 2016.
- STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.10, n.82, p.2-10, 2017.
- WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.6, n.1, p.39-62, 2011.

## LEISHMANIOSES NO BRASIL: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, DESAFIOS E PERSPECTIVAS

**Fredy Galvis-Ovallos<sup>1</sup>, Rafaella Albuquerque e Silva<sup>2</sup>, Vanessa Gusmon da Silva<sup>3</sup>,  
Priscila Basan Sabio<sup>1</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>1</sup>**

1. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, São Paulo, São Paulo, Brasil;
2. GT – Leishmanioses, Coordenação Técnica das Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial (CGZV), DEIDT/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília – DF, Brasil;
3. Universidade de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, São Paulo, São Paulo, Brasil.

### RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas pela infecção com protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas ao humano pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos. De forma geral, as leishmanioses podem ser divididas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) e estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo consideradas doenças negligenciadas. As leishmanioses apresentam uma rede causal complexa com diferentes determinantes na esfera ambiental, social e cultural. A transmissão é modulada por condições ambientais que favorecem a interação de reservatórios das *Leishmania* com vetores e hospedeiros susceptíveis no espaço e no tempo. Nas Américas, a LV tem como agente etiológico *Leishmania infantum* que é transmitida por *Lutzomyia longipalpis*, espécie amplamente distribuída no Brasil. LV é a forma mais severa das leishmanioses, podendo ser fatal quando não tratada. A LT é causada por várias espécies de *Leishmania* que são transmitidas por uma ampla diversidade de flebotomíneos. No Brasil, os flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, entre outros e, até o momento, tem sido registradas 266 espécies. Todavia, poucas delas tem sido incriminadas como vetores dos agentes das leishmanioses. Neste capítulo, apresentamos alguns aspectos gerais das leishmanioses, incluindo informações dos agentes etiológicos, dos vetores, bem como a situação epidemiológica atual e uma descrição sucinta dos desafios e perspectivas para o controle. **Palavras-chave:** *Leishmania*, Epidemiologia e Doença negligenciada

### ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by the infection with protozoans of the *Leishmania*, genus, transmitted to humans by the bites of infected sand flies females. In general, leishmaniasis can be distinguish as visceral leishmaniasis (VL) and tegumentary leishmaniasis (LT) and are largely distributed in the tropical and subtropical regions being considered neglected diseases. Leishmaniasis shows a complex causal-web with different

determinants in the environmental, social and cultural spheres. The transmission is modulated by environmental conditions that contributes to the interaction between *leishmania* reservoirs, vectors and susceptible host in a spatial-temporal scale. The etiological agent of VL in the Americas is *Leishmania infantum* which is transmitted mainly by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, species broadly distributed in Brazil. VL is the more severe form of the leishmaniasis and if untreated could be fatal. LT is caused by various species of *Leishmania* and transmitted by a large diversity of sand flies. In Brazil, sand flies are known with common names including mosquito palha and birigui. and currently 266 species were registered, however, only some species have been incriminated as vectors of leishmaniasis agents. In this chapter, we presented some general aspects of leishmaniasis in Brazil, including information about the agents, vectors, the current epidemiological situation and a short description of some challenges and perspectives for their control.

**Keywords:** *Leishmania*, Epidemiology and Neglected Disease.

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças tropicais que acometem, principalmente, pessoas em situação de vulnerabilidade social e são consideradas doenças negligenciadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019). Amplamente distribuídas no mundo, as leishmanioses são encontradas em 98 países aproximadamente, em regiões tropicais e subtropicais (ALVAR et al., 2012; OMS, 2019).

No Brasil, as leishmanioses constituem importante problema de saúde pública, devido ao seu elevado número de casos registrados anualmente, ampla distribuição geográfica e a complexidade para o seu controle, que é inerente aos ciclos de transmissão que envolvem diversas espécies de vetores, agentes etiológicos e reservatórios (BRASIL, 2015). As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e transmitidas por pequenos dípteros da subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, tatuquira, asa branca, caravela, entre outros.

De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser classificadas como leishmaniose visceral (LV) ou leishmaniose tegumentar (LT). A LV acomete órgãos como o fígado e o baço, e constitui a forma mais severa destas doenças que, quando não tratada, apresenta elevada letalidade (mortes entre aqueles que adoecem). A LT inclui as formas cutâneas, muco-cutânea e difusa (BRASIL, 2017) e, embora apresentem baixa mortalidade e sejam caracterizadas majoritariamente pela presença de lesões cutâneas, quando acometem a face do indivíduo, comprometem o septo nasal (formas muco-cutâneas), ou ainda, se apresentam disseminadas (difusa), podem causar impacto

psicossocial pela estigmatização do paciente, além de causar incapacidade temporária aos indivíduos acometidos.

As leishmanioses apresentam uma rede causal complexa com diferentes determinantes na esfera ambiental, social e cultural. Entre esses determinantes, a condição socioeconômica, desnutrição, migração, condições ambientais e mudanças climáticas, têm sido considerados como os principais fatores de risco associados à ocorrência das leishmanioses (OMS, 2019). No Brasil, nas últimas décadas, diferentes pesquisas têm mostrado a expansão geográfica da LV e aumento da notificação da LT, associadas a esses fatores. No estado de Mato Grosso, por exemplo, a expansão da LV e a distribuição dos principais vetores foi associada ao aumento do fluxo migratório e crescimento urbano desordenado (MESTRE; FONTES, 2007). Similarmente, no estado de São Paulo, pesquisas associaram a expansão da LV à construção de um gasoduto ligando a Bolívia ao Brasil, assim como o fluxo de pessoas por rodovias que cortam o território paulista (CARDIM et al., 2013; SEVÁ et al., 2017). Já em Pernambuco, a sua expansão foi associada ao aumento do fluxo migratório do Agreste e Sertão para a capital do estado, que associado ao déficit nutricional das crianças pode potencializar a ocorrência da LV de forma epidêmica (DANTAS-TORRES, 2006).

Outro fator de suma importância e que está relacionado ao maior número de casos e o avanço geográfico da LV no Brasil é a urbanização do seu principal vetor, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Diptera: Phlebotominae), resultando em um maior contingente de susceptíveis expostos, quando comparado ao de áreas rurais (SALOMÓN et al., 2015). Acresce-se a isto, o aumento da migração de pessoas que contribui para a transferência de cães infectados de áreas endêmicas para áreas sem transmissão. Nestas, embora muitas vezes sem a presença de *Lu. longipalpis*, podem existir outras espécies de flebotomíneos (vetores permissivos) que podem vir a transmitir o agente e estabelecer novos focos de transmissão.

Em relação aos fatores de risco associados à ocorrência de casos da LT, destaca-se que são mais numerosos, devido à diversidade de agentes etiológicos, de vetores e de hospedeiros. Os aspectos bioecológicos associados a esses componentes, modulam de forma diferente a ocorrência da LT. As formas tegumentares podem ocorrer em ambientes de florestas primárias, associadas a atividades extrativistas, de lazer e entre outras (BRASIL, 2017). Todavia, a LT também pode ocorrer em ambientes rurais, onde remanescentes de mata favorecem o desenvolvimento de vetores e hospedeiros, e a

proximidade dos domicílios permite o contato dos humanos com vetores infetados (OPS, 2019).

Desse modo, no presente capítulo, apresentamos alguns aspectos epidemiológicos das leishmanioses, incluindo informações dos agentes etiológicos, dos vetores, da situação epidemiológica atual, bem como dos desafios e perspectivas para o controle.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses possuem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. São digenéticos, ou seja, para completar seu ciclo de vida necessitam parasitar mais de um hospedeiro (FORATTINI, 1973). No caso, um hospedeiro vertebrado e o outro invertebrado (vetor). No hospedeiro vertebrado apresentam-se como formas intracelulares – infectando macrófagos onde se multiplicam, e, no vetor (flebotomíneo), as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo das fêmeas se multiplicam em formas flageladas (extracelulares), denominadas promastigotas, no intestino do inseto (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

O ciclo no vetor inicia-se com a diferenciação das formas amastigotas em formas procíclicas que são pequenas formas móveis que abundam durante as primeiras 24 horas após o repasto sanguíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012). A multiplicação destas formas ocorre dentro da matriz peritrófica, estrutura proteica, na qual o sangue é confinado para a sua digestão na parte posterior do intestino médio (abdominal) da fêmea. Entre 48 a 72 horas do repasto sanguíneo, as formas procíclicas se diferenciam em nectomonas, as quais escapam da matriz peritrófica e se fixam nas microvilosidades do epitélio no lúmen do intestino. No quarto e quinto dia após o repasto, as formas nectomonas migram para a região anterior do intestino médio (torácica) e se diferenciam em formas leptomonas, que entram em um novo ciclo proliferativo, onde se diferenciam em haptomonas que colonizam a válvula estomodeal, e finalmente, em formas metacíclicas infectivas. No intestino médio torácico, ocorre um grande acúmulo de flagelados que produzem filamentos proteofosfoglicanos, formando um tampão semelhante a gel (gel secretado pelas promastigotas) que obstrui o intestino. As formas haptomonas causam danos ao

revestimento de quitina e às células epiteliais da válvula estomodeal, interferindo no seu funcionamento que em um repasto sanguíneo subsequente da fêmea, facilita o refluxo do sangue juntamente com as formas metacíclicas infectantes devido à barreira formada pelo tampão (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; BATES, 2007; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

O gênero *Leishmania* possui os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo possível identificá-los de acordo com o local de desenvolvimento no interior do intestino do vetor. As espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e anterior do intestino, denominadas espécies suprapiláricas, enquanto que as espécies do subgênero *Viannia* se desenvolvem no intestino médio, anterior e posterior, e são denominadas peripiláricas (LAINSON; WARD; SHAW, 1977). No Brasil tem sido registrada oito espécies de *Leishmania* (Quadro 1), incluindo a *L. (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908, agente da LV, assim como as principais espécies associadas a ocorrência das formas dermatópicas: *L. (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911), *L. (Viannia) guyanensis* Floch, 1954 e *L. (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972.

**Quadro 1.** Distribuição das espécies de *Leishmania* e as formas clínicas, assim como os vetores e os reservatórios comprovados ou suspeitos envolvidos na transmissão da LT no Brasil.

| <b>Espécie de <i>Leishmania</i></b> | <b>Unidades Federativas</b>   | <b>Forma clínica</b> | <b>Vetores (comprovados ou suspeitos)</b>   | <b>Reservatórios (comprovados ou suspeitos)</b>   |
|-------------------------------------|---|----------------------|---|---|
| <i>L.(L.) infantum</i>              | AL, AP, BA, CE, DF, ES, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RO, RR, RS, SC, SE, SP, TO,DF | LV                   | <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Migonemyia migonei</i> , <i>Pintomyia fischeri</i>                                       | <i>Canis familiaris</i> , <i>Cerdocyon thous</i> , <i>Dusicyon vetulus</i> , <i>Didelphis marsupialis</i> |
| <i>L. (L.) amazonensis</i>          | AC, AM, BA, CE, GO, MA, MG, MT, MS, PA, RO, SC, TO  | LC, LCD              | <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> , <i>Bi. reducta</i> , <i>Bi. olmeca nociva</i> , <i>Bi. olmeca bicolor</i> , <i>Nyssomyia whitmani</i> , | <i>Proechimys</i> spp., <i>Oryzomys</i> spp.  |

|                             |  |        |   |  |
|-----------------------------|--|--------|---|--|
| <i>L. (V.) braziliensis</i> | AC, AL, AM, AP, BA, CE, DF, ES, GO, MA, MG, MT, MS, PA, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RO, RR, RS, SC, SE, SP, TO | LC, LM | <i>Psychodopygus wellcomei</i> ,<br><i>Nyssomyia whitmani</i> ,<br><i>Ny. intermedia</i> ,<br><i>Ny. neivai</i> ,<br><i>Ny. shawi</i> ,<br><i>Ny. whitmani</i> ,<br><i>Evandromyia edwardsi</i> ,<br><i>Migonemyia migonei</i> ,<br><i>Pintomyia fischeri</i> ,<br><i>Pi. pessoai</i> ,<br><i>Psychodopygus amazonensis</i> ,<br><i>Ps. chagasi</i> ,<br><i>Ps. hirsutus hirsutus</i> ,<br><i>Ps. paraensis</i> ,<br><i>Ps. squamiventris</i> | <i>Bolomys</i> spp.,<br><i>Nectomys</i> spp.,<br><i>Rattus rattus</i> ,<br><i>Akodon arviculoides</i> ,<br><i>Thrichomys</i> spp.            |
| <i>L. (V.) guyanensis</i>   | AC, AM, AP, PA, RR   | LC, LM | <i>Nyssomyia umbratilis</i> ,<br><i>Ny. anduzei</i> ,<br><i>Ny. whitmani</i>  | <i>Choloepus</i> spp.<br><i>Tamandua</i> spp.<br><i>Didelphis</i> spp.<br><i>Proechimys</i> spp.   |
| <i>L. (V.) lainsoni</i>     | AC, PA, RO   | LC     | <i>T. ubiquitalis</i>   | <i>Agouti paca</i>   |
| <i>L. (V.) naiffi</i>       | AM, PA,  | LC     | <i>Ps. amazonensis</i> ,<br><i>Ps. ayrozai</i> ,<br><i>Ps. paraensis</i> ,<br><i>Ps. squamiventris</i>  | <i>Dasypus novemcinctus</i>  |
| <i>L. (V.) shawi</i>        | MA, PA, PI   | LC     | <i>Nyssomyia whitmani</i>   | <i>Cebus apella</i> ,<br><i>Chiropotes satanus</i> ,<br><i>Nasua nasua</i> ,<br><i>Bradypus tridactylus</i> ,<br><i>Choloepus didactylus</i> |
| <i>L. (V.) lindenberg</i>   | PA   | LC     | <i>Nyssomyia antunesi</i>   | desconhecido   |

Legenda: AC – Acre, AL – Alagoas, AM – Amazonas, AP – Amapá, BA – Bahia, CE – Ceará, DF – Distrito Federal, ES – Espírito Santo, GO – Goiás, MA – Maranhão, MG – Minas Gerais, MT – Mato Grosso, MS – Mato Grosso do Sul, PA – Pará, PB – Paraíba, PE – Pernambuco, PI – Piauí, PR – Paraná, RJ – Rio de Janeiro, RN – Rio Grande do Norte, RO – Rondônia, RR – Roraima, RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina, SE – Sergipe, SP – São Paulo, TO – Tocantins; LC – leishmaniose cutânea, LCD – leishmaniose cutânea difusa, LM – leishmaniose mucocutânea. (BRASIL, 2017, OMS, 2019, MIRANDA; DIAS, 2011)

## 2.2 RESERVATÓRIOS DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

Devido à diversidade das espécies dos agentes etiológicos, os reservatórios das leishmanias incluem uma ampla variedade de vertebrados, principalmente animais silvestres, e no caso da LV, também animais domésticos. Mamíferos das ordens Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata e Chiroptera apresentam espécies comprovadas ou suspeitas de participarem como reservatórios das leishmanias (ROQUE; JANSEN, 2014). Todavia, a maioria das espécies ainda são consideradas suspeitas pela ausência de pesquisas que comprovem seu papel epidemiológico nos ciclos de transmissão (BRASIL, 2017). As principais espécies comprovadas ou suspeitas de serem reservatórios são apresentadas no quadro 1.

Para a LV, os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) constituem o principal reservatório de *Le. infantum*, sendo fonte de infecção aos vetores e fator de risco para a ocorrência de casos humanos (DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR, 1959). No entanto, o papel epidemiológico de outros animais domésticos, como gatos (*Felis Catus*), ainda precisa ser melhor elucidado (SILVA et al., 2010). As raposas das espécies *Cerdocyon thous* e *Dusicyum vetulus* têm sido apontadas entre os reservatórios silvestres da doença (DEANE; DEANE, 1954), enquanto que o papel epidemiológico dos gambás, incluindo as espécies *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris*, e *D. aurita*, necessita de mais esclarecimentos (CARREIRA et al., 2012; CARRANZA-TAMAYO; WERNECK; ROMERO, 2016; BRASIL, 2017).

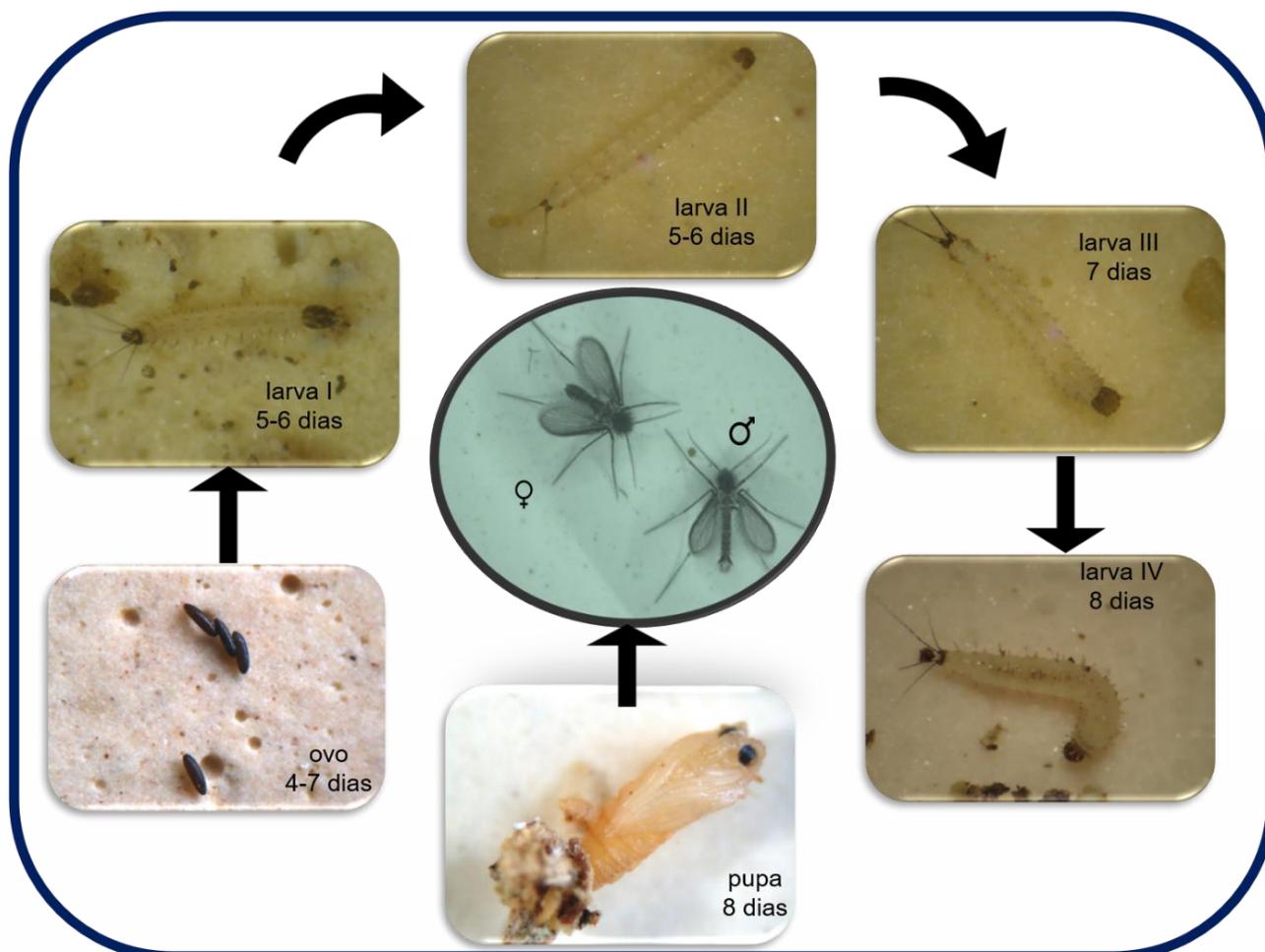
Quanto aos reservatórios dos agentes causadores da LT, há ainda necessidade de mais investigação para sua incriminação, uma vez que são majoritariamente silvestres. As três principais espécies de leishmanias que causam manifestação tegumentar no Brasil apresentam como reservatórios tanto espécies silvestres quanto sinantrópicas, como preguiças, tamanduás, gambás e principalmente roedores (BRASIL, 2017). Para a *Le. amazonensis*, roedores de dois gêneros, *Proechimys* e *Oryzomys*, têm sido descritos como reservatórios, enquanto que para *Le. guyanensis*, tem sido apontadas preguiças do gênero *Choloepus*, tamanduás do gênero *Tamandua* e gambás do gênero *Didelphis* (OPS, 2019). Para a *Le. braziliensis*, devido a sua ampla distribuição, uma lista maior de reservatórios tem sido descrita na literatura, principalmente de roedores (Quadro 1). Para uma atualização mais profunda sobre os reservatórios comprovados e suspeitos, recomenda-se a leitura da revisão de Roque; Jansen (2014).

## 2.3 VETORES DAS LEISHMANIAS

Os vetores dos agentes etiológicos das leishmanioses estão classificados na família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. No mundo, são descritas 1026 espécies (994 atuais e 32 fósseis); nas Américas são 546, das quais 529 são atuais e 17 fósseis (GALATI, 2019), sendo 266 delas registradas no Brasil (GALATI, 2019). No entanto, apenas cerca de 10% dessas espécies são incriminadas ou suspeitas de transmitirem os agentes causadores das leishmanioses (CIPA GROUP, 1999; MAROLI et al., 2013).

Os flebotomíneos habitam ambientes de floresta primária, assim como em remanescentes de mata nas áreas rurais ou urbanas e cavernas (GALATI, 2019). Algumas espécies se adaptaram ao ambiente antrópico, ocorrendo em peridomicílios de ambiente rural ou urbano. Os machos se alimentam de seiva de plantas que fornecem a energia necessária para a sobrevivência e reprodução. As fêmeas, além de açúcares presentes nas seivas, precisam de sangue como fonte de proteína para o desenvolvimento dos ovos (FORATTINI, 1973).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, que na fase imatura passam pela fase de ovo, larval (quatro estádios) e pupa (Figura 1). A duração da fase imatura, que ocorre em ambiente terrestre, rico em matéria orgânica e protegido da luz solar direta, tem duração média de 45 dias, todavia, podendo variar de acordo com a espécie, temperatura e fonte de alimentação (RANGEL et al., 1985; GALVIS-OVALLOS, 2016). Os adultos deslocam-se em voos curtos e sua dispersão depende da disponibilidade de alimento, mas em geral, não se afastam muito de seus abrigos. Estudos mostram que em áreas abertas e com vento, os flebotomíneos podem se deslocar por até dois quilômetros de distância; todavia, em condições favoráveis de oferta de alimento e abrigos, sua dispersão não ultrapassa 200 metros (FORATTINI, 1973; KILLICK-KENDRICK et al., 1984; ALEXANDER; YOUNG, 1992; GALVIS-OVALLOS et al., 2018).



**Figura 1.** Representação do ciclo vida de flebotomíneos representado por *Nyssomyia withmani*.

Imagens ilustrativas com diferentes escalas.

## 2.4 PRINCIPAIS VETORES DAS LEISHMANIAS NO BRASIL

Embora o Brasil possua uma elevada diversidade de espécies de flebotomíneos, para poucas tem sido demonstrado o seu papel epidemiológico como vetores na transmissão das leishmanias. Isto porque, a incriminação de uma espécie como vetor depende da análise dos parâmetros da capacidade vetorial, o que é basicamente uma estimativa da eficiência com que uma espécie pode transmitir um patógeno (GARRETT-JONES; SHIDRAWI, 1969). A capacidade vetorial envolve parâmetros como a densidade do vetor, o hábito de picada, a sobrevivência da população do vetor e a competência vetorial, que implica na capacidade de se infectar e transmitir o patógeno para um hospedeiro. Portanto, este último parâmetro envolve a relação parasita-vetor que determinará a eficiência no desenvolvimento de formas infectivas do parasita no vetor (REISEN, 1989;

GALVIS-OVALLOS et al., 2017). Poucos são os estudos que abordam a capacidade vetorial dos flebotomíneos (CASANOVA; NATAL; SANTOS, 2009), sendo a maioria das espécies apontadas como vetores potenciais com base em critérios epidemiológicos, incluindo a densidade no foco da transmissão e distribuição geográfica coincidente com a ocorrência dos casos humanos. No Brasil, as espécies com maior grau de evidências sobre seu papel na transmissão dos agentes das leishmanioses são apresentadas a seguir.

#### **2.4.1 *Bichromomyia flaviscutellata***

Embora apresente hábitos alimentares pouco antropofílicos, é considerada como o principal vetor da *Le. amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1968). A sua alta atratividade por roedores do gênero *Proechimys*, principais reservatórios da *Le. amazonensis*, indica que sua densidade é mais elevada a nível do chão, e justamente por apresentar esta característica comportamental, *Bi. flaviscutellata* possui voos baixos, sendo facilmente coletada por armadilha de Disney, utilizando roedores como isca (LAINSON; SHAW, 1968; DORVAL et al., 2010). Apresenta ampla distribuição geográfica no país, com maior densidade nos estados localizados sob influência do bioma amazônico (Acre, Amapá, Amazonas e Roraima). Também tem sido descrita em áreas da Mata Atlântica (Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Pará), Caatinga (Ceará) e Cerrado (Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Tocantins) (GALATI, 2019). A princípio, *Bi. flaviscutellata* era considerada estritamente silvestre, entretanto, estudos recentes apontam para uma alteração comportamental, com potencial grau de sinantropismo pela sua adaptação a ambientes sob pressões ecológicas, tais como áreas de vegetação secundária e ambientes com alterações antrópicas (REBÊLO et al., 1999; BARROS; REBÊLO; SILVA, 2000; FURTADO et al., 2016).

#### **2.4.2 *Migonemyia migonei***

Essa espécie está associada à transmissão de *Le. braziliensis* em diversas regiões do Brasil, principalmente para os estados do Ceará e Rio de Janeiro (AZEVEDO; RANGEL; QUEIROZ, 1990; RANGEL; LAINSON, 2009). Apresenta alto grau de antropofilia e hábitos alimentares oportunistas. Também é vetor da *Le. infantum* (GUIMARÃES et al., 2016; BRASIL, 2017). No Brasil, *Mg. migonei* apresenta ampla distribuição geográfica, presente nos seguintes estados: Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo,

Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Roraima, Tocantins, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (GALATI, 2019).

#### **2.4.3 *Nyssomyia intermedia***

Apresenta alto grau de antropofilia e está associada a transmissão de *Le. braziliensis*, principalmente na região Sudeste do Brasil, ocorrendo tanto em ambiente silvestre, quanto em ambiente antrópico associados ao peri e intradomicílio (RANGEL et al., 1984; SILVA; GOMES, 2001; AFONSO et al., 2005). Embora com ampla distribuição geográfica no Brasil, essa espécie é predominante nas áreas de Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Também tem sido registada em Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (GALATI, 2019).

#### **2.4.4 *Nyssomyia neivai***

Essa espécie está associada com a transmissão de *Le. braziliensis* principalmente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sendo encontrada em ambientes mais secos e frios do país quando comparada com *Ny. intermedia* (MARCONDES; LOZOVEI; VILELA, 1998), bem como em ambiente antrópico de peri e intradomicílio, onde é altamente atraída pelo homem (BRASIL, 2017). No Brasil, *Ny. neivai* tem sido registrada no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (GALATI, 2019).

#### **2.4.5 *Nyssomyia umbratilis***

Considerada o principal vetor da *Le. guyanensis* (OPS, 2019). Estudos ecológicos demonstraram que *Ny. umbratilis* apresenta maior densidade na copa das árvores, prevalecendo o ciclo silvestre (AZEVEDO et al., 1993). Essa espécie geralmente se alimenta em animais silvestres e, posteriormente, repousa em estratos mais baixos, podendo ser encontrada no tronco das árvores de grande porte. *Nyssomyia umbratilis* demonstra ser bastante antropofílica, uma vez que ataca avidamente o homem quando este

adentra no ambiente silvestre (AZEVEDO et al., 1993). No Brasil, a espécie apresenta distribuição principalmente na região amazônica, sendo registrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima, assim como também nos estados de Pernambuco, Ceará e Alagoas (GALATI, 2019).

#### **2.4.6 *Nyssomyia whitmani***

Constitui um dos principais vetores de importância epidemiológica por apresentar a maior distribuição geográfica no Brasil, não sendo registrada apenas nos estados de Roraima e Santa Catarina (GALATI, 2019). *Nyssomyia whitmani* está associada, principalmente, à transmissão de *Le. braziliensis*, mas também de *Le. amazonensis*, *Le. guyanensis* e *Le. shawi* (BRASIL, 2017). Apontada como um complexo de espécies, apresenta padrões comportamentais distintos dependendo da localidade onde se encontra (LAINSON, 1988).

#### **2.4.7 *Pintomyia fischeri***

Apontada como vetor secundário da *Le. braziliensis* devido a sua abundância em áreas de transmissão, bem como pela endofilia e antropofilia comprovada (BRASIL, 2017; SUCEN, 2018), essa espécie também é considerada vetor suspeito da *Le. infantum* na região da Grande São Paulo (GALVIS-OVALLOS et al., 2017) e em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RÊGO et al., 2019). Está amplamente distribuída nos estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (GALATI, 2019), todavia suas maiores abundâncias são observadas no bioma da Mata Atlântica.

#### **2.4.8 *Pintomyia pessoai***

Vetor secundário da *Le. braziliensis* – principalmente por evidência epidemiológica (BRASIL, 2017) – que, no Brasil, está distribuído nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (GALATI, 2019).

#### **2.4.9 *Psychodopygus wellcomei***

Considerado um dos principais vetores da *Le. braziliensis*, com hábito principalmente silvestre, apresenta alto grau de antropofilia, podendo se alimentar, inclusive, durante o dia (RANGEL; LAINSON, 2009). No Brasil a espécie está distribuída nos estados do Amazonas, Ceará, Maranhão, Pará, Pernambuco e Rio Grande do Norte (GALATI, 2019).

#### **2.4.10 *Psychodopygus ayrozai***

No Brasil, a espécie apresenta ampla distribuição geográfica com presença nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Santa Catarina e São Paulo (GALATI, 2019). Essa espécie é apontada como vetor da *Le. naiffi* e estudos demonstram que *Ps. ayrozai* possui distintos graus de antropofilia, dependendo da localidade (LAINSON, 2010), com alto grau de antropofilia na região montanhosa do Sudeste do Brasil (PINTO et al., 2010).

#### **2.4.11 *Trichophoromyia ubiquitalis***

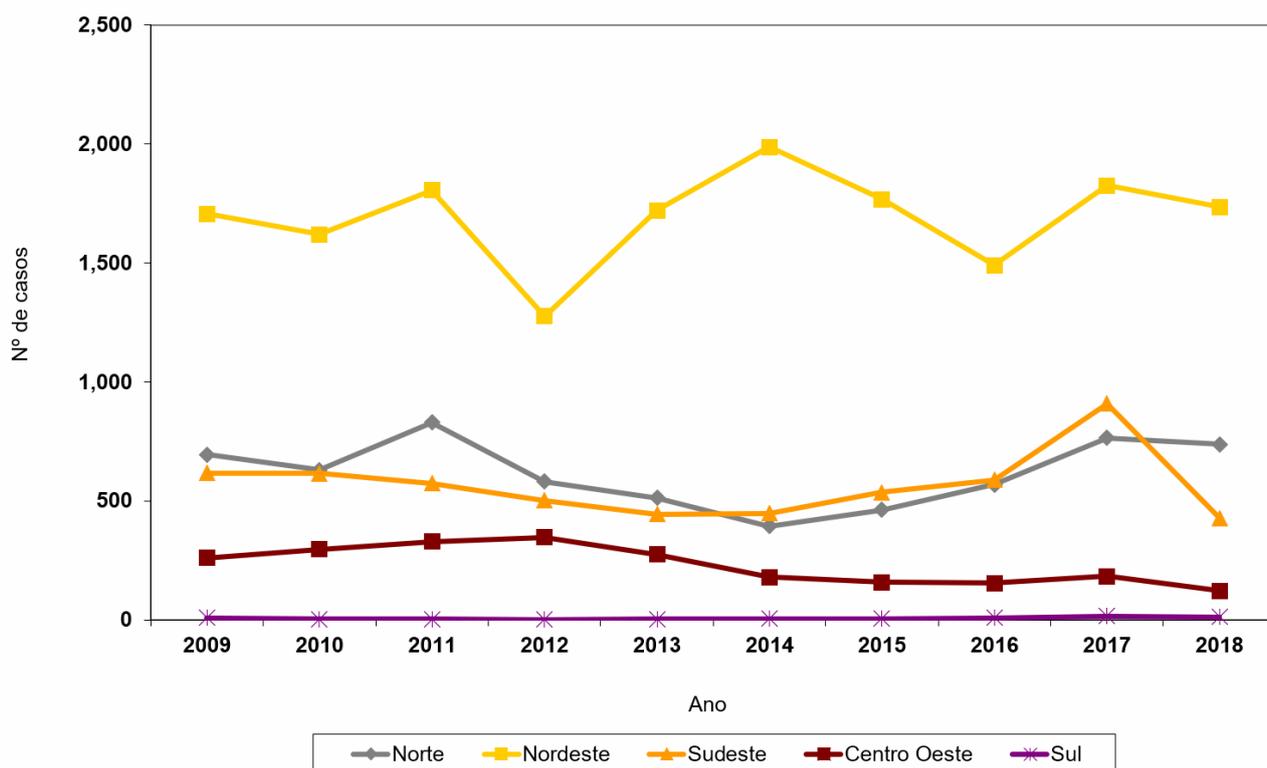
Responsável pela transmissão da *Le. lainsoni*, é uma espécie muito abundante em focos de transmissão na região Amazônica, sendo encontrada nos estados de Acre, Pará e Rondônia (GALATI, 2019). Embora, apresente baixo grau antropofílico no seu hábitat natural, estudos ainda são necessários para conhecer o papel epidemiológico desta espécie na transmissão de outras leishmanioses (BRASIL, 2017; RANGEL; LAINSON, 2003).

### **2.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES NO BRASIL**

No Brasil, a LV é causada pela espécie *Le. infantum* e apresenta animais silvestres e domésticos como reservatórios, sendo seu principal vetor a espécie *Lu. longipalpis* (OPS, 2019), que apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrada em 25 dos 26 estados da Federação. No entanto, *Lu. cruzi* e *Mg. migonei* também são reconhecidas como vetores, respondendo pela transmissão em áreas endêmicas delimitadas (BRASIL, 2015). Outra espécie que tem chamado a atenção é a *Pi. fischeri*, vetor potencial na região

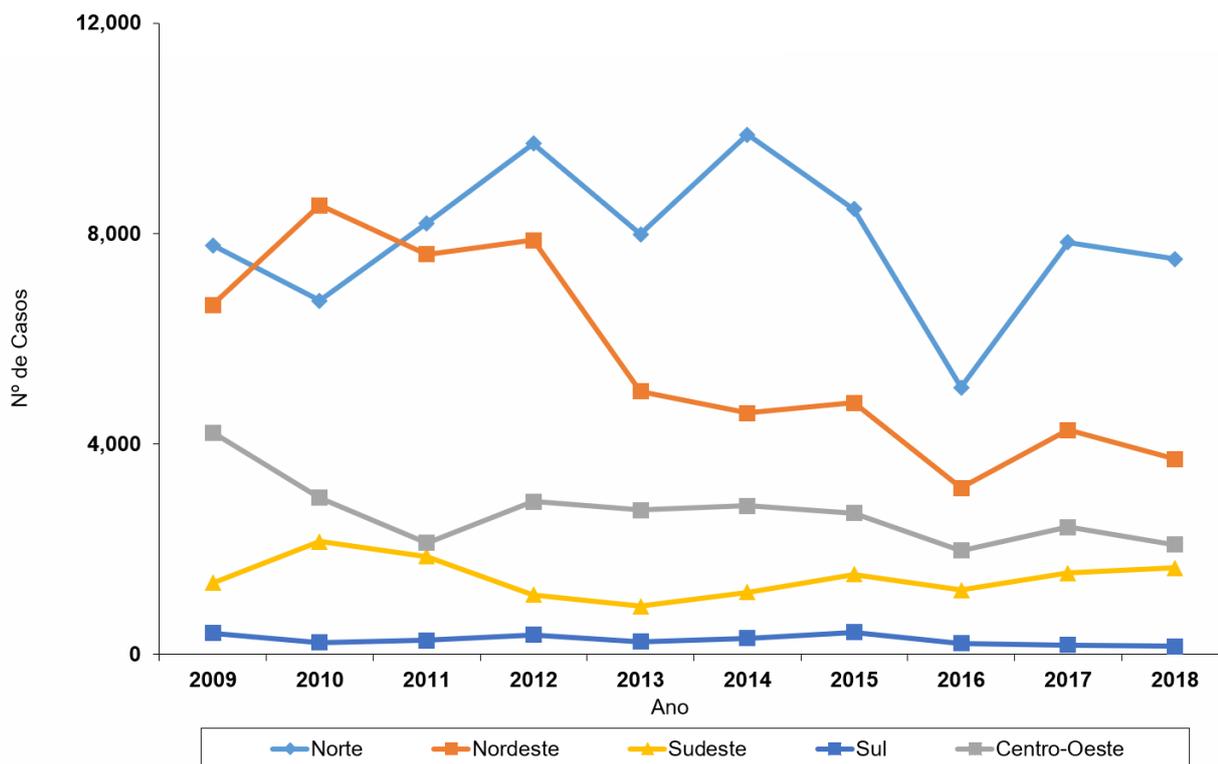
metropolitana de São Paulo (GALVIS-OVALLOS et al., 2017), assim como em outras áreas na região Sul do Brasil, onde o principal vetor não tem sido registrado (RÊGO et al., 2019).

Entre o período de 2001 a 2017, foram confirmados 59.769 casos de LV no continente americano, com média anual de 3.516 casos. Quanto a ocorrência de casos de LV, no continente americano no período de 2001 a 2017, foram confirmados 59.769 casos de LV, com média anual de 3.516 casos (BRASIL, 2020). O Brasil é o país que concentra o maior percentual de casos (mais de 96% dos registros) (OPS, 2019). Historicamente, a ocorrência de LV era restrita aos municípios da região Nordeste do país, que concentrava mais de 80% dos casos na época de 1980. Porém, atualmente, todas as regiões do país registram casos desta doença (Figura 2). Os estados do Amazonas, Acre e Rondônia não possuem casos humanos de LV, no entanto, estes dois últimos já confirmaram casos autóctones de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (comunicação pessoal – RAS), que geralmente precede a ocorrência de casos humanos.



**Figura 2.** Distribuição de casos de Leishmaniose visceral no Brasil segundo região, entre 2009 e 2018.  
Fonte (BRASIL, 2020).

Em 2018, o Brasil confirmou 3.466 casos novos de LV, com coeficiente de incidência de 1,66 casos/100.000 habitantes. O Nordeste continua sendo a região que concentra o maior número dos casos, com 50,1%, seguida do Norte e Sudeste. No tocante a LT, neste mesmo ano, foram notificados 16.432 casos em todo o país (BRASIL, 2020), sendo a região Norte aquela com maior concentração de casos (45,8%) (Figura 3).



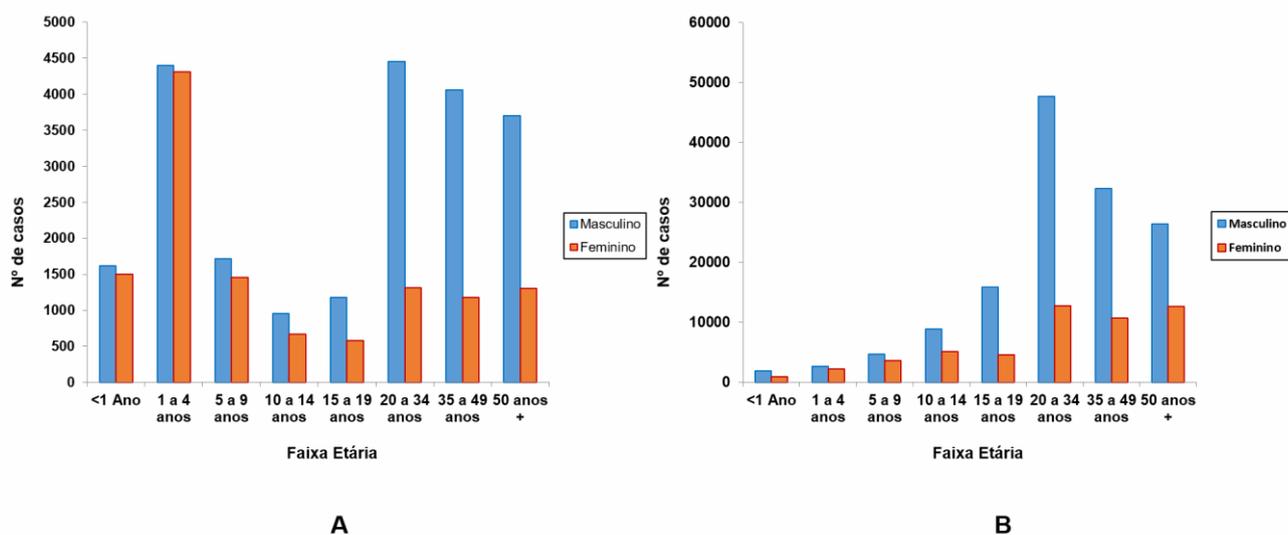
**Figura 3.** Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar no Brasil segundo região, entre 2009 e 2018.  
Fonte (BRASIL, 2020).

A Organização Pan-Americana de Saúde propôs, em 2019, a utilização de um indicador denominado indicador composto, para identificar as áreas mais atingidas pelas leishmanioses (OPS, 2019). Este indicador é calculado a partir da média de casos e de incidência nos últimos três anos para LV, enquanto que para LT é utilizado o índice normalizado de casos, incidência e densidade. O uso destes indicadores compostos tem como finalidade apontar os municípios prioritários e facilitar a tomada de decisão referente às medidas de prevenção e controle a serem adotadas.

Segundo esta classificação, em 2019 os estados que apresentaram o maior número de municípios prioritários para LV foram Minas Gerais (25), Maranhão (24), Pará (11) e Tocantins (11), seguidos dos estados do Ceará e Piauí, ambos com cinco. O município de Fortaleza, no estado do Ceará, é, desde 2010, a capital com maior número de casos de LV do país. Ainda na região Nordeste, os municípios de Teresina (PI) e São Luís (MA) albergam 28% e 14% dos casos confirmados no Brasil, respectivamente (COSTA et al., 1995; MENDES et al., 2002; CAVALCANTE; VALE, 2014).

Na região Sudeste, enfatiza-se a relevância do estado de Minas Gerais, devido a sua grande extensão territorial, bem como à alta frequência e ampla distribuição de casos de LV. Em 2015, Minas Gerais foi o terceiro estado em número de casos. A capital, Belo Horizonte, faz parte dos 10 municípios com maior número de casos no período de 2010 a 2015, e é um dos municípios brasileiros com a maior taxa de letalidade do país (BEVILACQUA et al., 2001; LOPES et al., 2010; BRASIL, 2017). Na região Norte, os estados do Pará e Tocantins são prioritários, entretanto, casos são confirmados anualmente em Roraima, em território indígena.

Considerando o processo de urbanização da LV, seria esperado que a exposição aos flebotômíneos ocorresse de maneira igualitária entre os sexos, sendo a ocorrência de casos similar entre estes. Todavia, seguindo a tendência de distribuição de casos da série histórica (Figura 4), em 2018, observou-se que 67,2% dos casos ocorreu na população masculina.



**Figura 4.** Distribuição de casos de Leishmaniose visceral (A) e Leishmaniose Tegumentar (B), no Brasil segundo faixa etária, entre 2009 e 2018.

Fonte (BRASIL, 2020).

Segundo Cloots et al. (2020) há necessidade de incluir fatores culturais e determinantes sociais para analisar a diferenças observada na ocorrência de casos entre os sexos. Estes autores observaram em Bangladesh que as mulheres recebem atendimento mais tardio nos hospitais, já que por questões culturais, crianças e homens têm prioridade no atendimento. Portanto, isto pode causar um viés de informação, quando usados dados secundários provenientes de bancos de notificação (CLOOTS et al., 2020). Neste contexto, observa-se que é necessário o desenvolvimento de estudos que demonstrem outros fatores relacionados à diferença de ocorrência da LV entre os sexos.

No Brasil, a concentração de casos de LT também é observada na população masculina na LT, correspondendo a 74,2% em 2018. Considerando que a transmissão pode ocorrer em ambiente silvestre, associado com atividades ocupacionais e de lazer, assim como em áreas rurais e periurbanas de colonização, e ao fato que o homem ainda exerce o papel de provedor/mantenedor em termos econômicos da família (características patriarcais) nas regiões onde ocorre a LT, – entende-se que o sexo masculino, de fato, é o mais exposto à infecção (BRASIL, 2017). No tocante à suscetibilidade fisiológica do sexo masculino à manifestação das doenças de LV e LT, alguns trabalhos sugerem que hormônios sexuais podem influenciar a resposta imunológica e, assim, alterar a patogênese das mesmas. Em condições experimentais, estudo descreveram diferenças em relação à carga parasitária e a manifestação clínica segundo sexo (TRAVI et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2018).

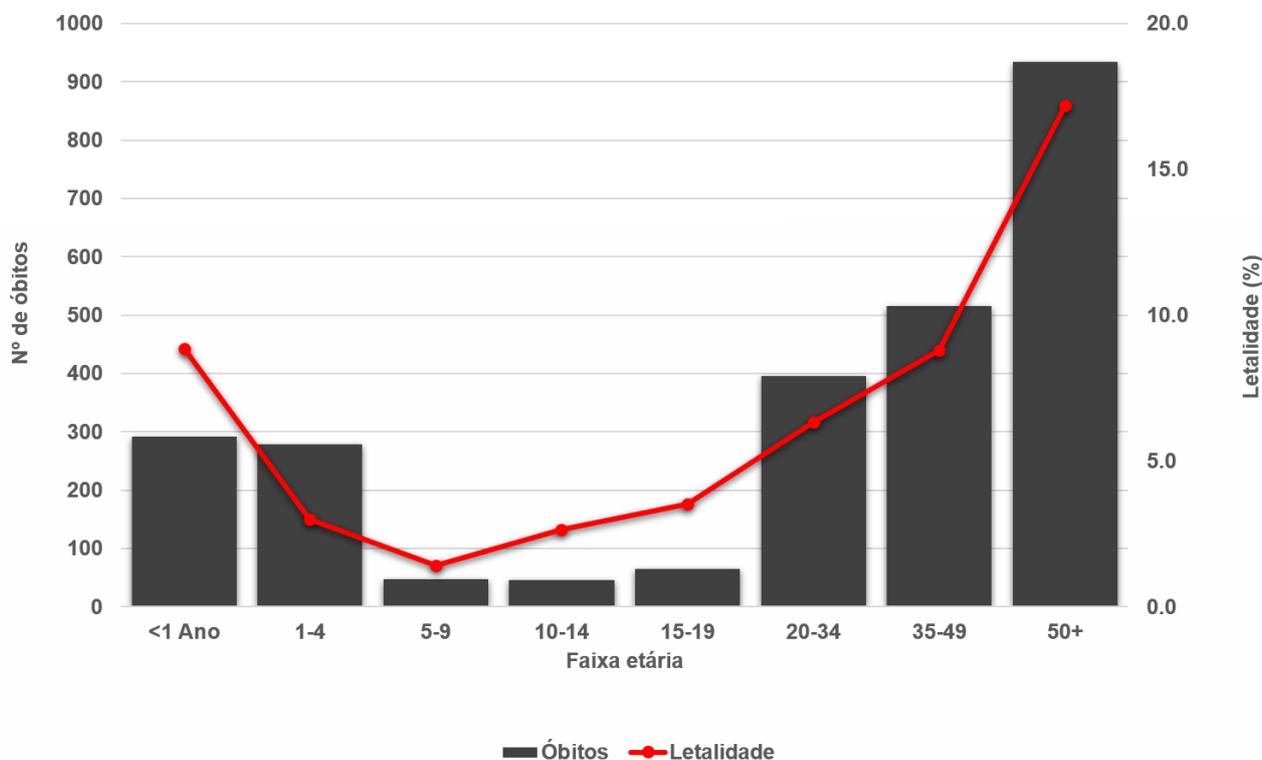
Um aspecto epidemiológico importante, e que distingue as duas leishmanioses, é que caso não tratada, a LV evolui para o óbito em 90% dos casos e, mesmo tratada apropriadamente, cerca de 10% dos casos evoluem para óbito; enquanto que a LT, dependendo da forma clínica apresentada, é uma doença autolimitante, sendo poucos os óbitos relacionados a esta, a exemplo disso, para o ano de 2018, foram notificados 11 óbitos em pacientes com LT (BRASIL, 2019). Sinais clínicos graves, como edema, dispneia, diarreia, vômito, manifestações hemorrágicas e falência renal estão associados com o óbito por LV, assim como achados laboratoriais de anemia grave, neutropenia e trombocitopenia (SAMPAIO et al., 2010; VARMA; NASEEM, 2010). Em 2018, a letalidade da LV no Brasil foi de 8,9% - a maior dos últimos 10 anos. Diversos fatores podem explicar este fato, entre estes, à qualidade da assistência à saúde, caracterizada pelo diagnóstico oportuno e tratamento adequado dos casos, como também à resposta imunológica desenvolvida pelos pacientes e todos os fatores associados a esta resposta (estado nutricional, coinfeções, entre outros).

Na LV, a infecção na população pode se apresentar de forma assintomática ou sintomática, dependendo da resposta imunológica dos indivíduos (OPS, 2019). Os hospedeiros imunocompetentes desenvolvem tanto a resposta imune inata, mediada por macrófagos, células NK e  $IFN\gamma$ ; como imune adaptativa, com predominância de células  $Th_1$ , o que controla a evolução da infecção, impedindo o surgimento da doença. Este tipo de resposta, mais específica a patógenos intracelulares, ocorre em pacientes resistentes à infecção, denominados assintomáticos. Por outro lado, hospedeiros sintomáticos possuem um perfil de resposta imune adaptativa para  $Th_2$ , com participação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , caracterizando resposta inadequada para o controle da infecção por *Le. infantum* (SHARMA; SINGH, 2009; MANSUETO et al., 2011; BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Por sua vez, a qualidade da resposta imunológica desenvolvida pelo indivíduo também está associada com a idade, o que impacta na carga parasitária apresentada pelo paciente e na gravidade da LV. Zacarias et al. (2017) avaliaram 625 pacientes, em estudo de coorte aberta, com o objetivo de avaliar a relação entre a carga de *Le. infantum*, quantificada por qPCR e a idade dos pacientes. Estes autores relataram que pacientes com um ano de vida apresentaram carga parasitária elevada, a qual decresceu nos anos subsequentes. Na faixa etária de 10 a 20 anos a carga atingiu o seu mínimo e então, voltou a aumentar gradualmente (ZACARIAS et al. 2017). Os extremos de idade apresentaram maior carga parasitária e letalidade, fenômeno provavelmente atribuível à imaturidade do sistema imunológico nos primeiros anos de vida e na imunossenescência da idade avançada (GOENKA; KOLLMANN, 2015; BANDARANAYAKE; SHAW, 2016). No Brasil, no período de 2009 a 2018, observou-se aumento da letalidade nos extremos de idade, o que poderia corroborar este fenômeno (Figura 5).

Outro fator associado à imunodeficiência é a desnutrição, que pode afetar tanto a gravidade da manifestação clínica quanto a carga parasitária. Segundo a literatura, a deficiência de micronutrientes, como vitamina A e zinco, influencia de maneira negativa a imunidade celular (HUGHES; KELLY, 2006). Avaliações relacionando a desnutrição com a gravidade da expressão clínica de LV realizadas em pacientes menores de 15 anos demonstraram que pacientes com LV grave tinham evidências de desnutrição, condição não observada em pacientes assintomáticos ou com infecção subclínica (BADARO et al., 1986). Similarmente, a desnutrição em menores de cinco anos, a partir dos indicadores índice de nutrição peso-para-idade e IMC-para-idade, demonstraram que a carga

parasitária de *Le. infantum* foi quatro vezes maior do que em pacientes sem desnutrição (ZACARIAS et al., 2017).



**Figura 5.** Distribuição de óbitos por Leishmaniose visceral e taxa letalidade segundo faixa etária, Brasil entre 2009 e 2018.  
Fonte (BRASIL, 2020).

A imunossupressão provocada comumente devido a infecções virais, como o HIV, é outro fator a ser considerado na letalidade da LV (BRASIL, 2015). Em 2018, o percentual de coinfeção LV/HIV no Brasil foi de 7,1%, sendo este valor menor do que nos anos anteriores. Entretanto, a letalidade neste grupo foi em torno de 12%, sendo maior do que na população geral. Como observa-se uma relação clara entre a coinfeção LV/HIV e o aumento da letalidade, existe a necessidade de identificação desses pacientes. Atualmente, todos os pacientes diagnosticados com HIV são testados para LV e vice-versa, e recomenda-se a profilaxia secundária com utilização de anfotericina B lipossomal com o objetivo de reduzir as recidivas, fator também associado ao óbito (BRASIL, 2015). Já o percentual de infectados LT/HIV é baixo, representando somente 1% dos casos

confirmados de LT em 2018. Isso ocorre porque o HIV é uma doença que ocorre principalmente em áreas urbanas, enquanto a LT em áreas silvestres, perirural e rural.

Vale ressaltar ainda, que a maior parte da população humana afetada pela infecção por *Le. infantum* no Brasil é assintomática (CARRANZA-TAMAYO; WERNECK; ROMERO, 2016; SANTOS-SILVA et al., 2017). Entretanto, estudos demonstram que uma parcela muito pequena dos pacientes infectados, cerca de 10 a 20%, desenvolvem a doença (BADARO et al., 1986; HOMMEL, 1999). Dessa forma, podemos estimar que para cada caso confirmado, temos de cinco a nove casos assintomáticos, demonstrando que a força de infecção é bem maior do que aquela detectada pelo sistema de saúde por meio das notificações dos casos sintomáticos. O Programa de Controle e Vigilância da LV (PCV-LV) do Ministério da Saúde preconiza o uso de provas diagnósticas somente em pacientes suspeitos, ou seja, aqueles residentes em áreas endêmicas que apresentam febre prolongada, anemia e hepatoesplenomegalia. A presença da infecção assintomática poderia ser relevante para alguns cenários endêmicos em relação à segurança da transfusão de sangue e hemoderivados pelo risco potencial de transmissão por essa via. Esta hipótese tem sido recentemente investigada e certamente merecerá atenção no futuro (ASFARAM et al., 2017; MONTEIRO et al., 2016).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A complexidade dos ciclos de transmissão das leishmanioses representa um grande desafio para a sua prevenção e controle. No caso da LV, as medidas adotadas no Brasil têm sido principalmente o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos (para diminuir a letalidade da doença), bem como a eutanásia de reservatórios domésticos, o controle vetorial e o manejo ambiental (BRASIL, 2017). Todavia, nos últimos anos, a eutanásia de cães tem sido menos aceita pela população de algumas regiões do país, implicando em um novo desafio para o controle de reservatórios da *Le. infantum* (SEVÁ et al., 2016). A rejeição pode estar relacionada a fatores culturais da interação homem-cão, já que nas últimas décadas o cão passou a constituir um elemento importante do núcleo familiar, e não simplesmente um animal de guarda ou companhia. Mas também deve ser considerado o fato que a presença de animais assintomáticos (aparentemente saudáveis)

afeta a percepção de risco dos seus cuidadores, mantendo estes animais infectados no domicílio, e rejeitando a sua eutanásia.

Com este cenário, deve-se reforçar a importância de um programa de controle com foco integrado, assim como introdução de novas ferramentas associadas ao controle. Neste sentido, o uso de coleiras impregnadas com inseticida tem-se mostrado com potencial para a redução da transmissão na população canina e humana (REITHINGER et al., 2004; COURA-VITAL et al., 2018; SILVA et al., 2018). Esta estratégia tem como preceito que o encoleiramento de cães domiciliados permite a interrupção do contato vetor-reservatório, reduzindo a população do vetor susceptível a infecção, e, portanto, reduzindo o risco para a população humana. Modelos matemáticos que avaliaram as diferentes estratégias usadas para o controle da LV mostraram que esta ferramenta é a mais eficiente na redução da sua incidência na população humana quando comparada com a eutanásia de cães (SEVÁ et al., 2016). No entanto, a sua aplicação a nível populacional precisa ser analisada em condições de campo, considerando a alta cobertura necessária, a taxa de perda de coleiras e outros problemas operacionais decorrentes deste tipo de intervenção (REITHINGER et al., 2004; ALVES et al., 2018).

Outros repelentes tópicos de liberação lenta têm sido desenvolvidos nos últimos anos, demonstrando alta eficácia contra flebotomíneos (MOLINA; LOHSE; NIETO, 2001; CUTOLO et al., 2018), sendo uma alternativa de proteção individual de cães. Todavia, como medida de saúde pública, sua aplicação apresenta dificuldades pela curta duração do efeito (30 dias) e implicações operacionais.

No Brasil, existe uma vacina aprovada para comercialização a fim de prevenir a LVC (Leish-Tec), no entanto, os resultados observados em condições de campo, não são unânimes quanto a sua eficácia. Grimaldi Jr et al. (2017) observaram resultados promissores, mas apontaram a necessidade de otimização para ser efetiva nessas condições. Outro estudo em condições de campo, demonstrou eficácia de 71% na prevenção de LVC (REGINA-SILVA et al., 2016). Por outro lado, Lopes et al. (2018) observaram que esta vacina não apresentou efetividade na proteção de cães contra LV. Com esta perspectiva, a vacina disponível pode ser considerada uma medida de proteção individual, mas como ferramenta de saúde pública não existem evidências claras sobre a efetividade na prevenção da LVC. Na Europa, as vacinas Canileish e Letifend são aprovadas para uso (MORENO, 2019), e apresentam perspectiva de uso no Brasil no futuro.

Outra expectativa referente a LVC é o tratamento de cães com a Miltefosina, o qual foi autorizado recentemente na Nota Informativa 001/2016—conjunta do Ministério da Agricultura e o Ministério da Saúde. Todavia, é importante salientar que este tratamento apresenta como principal característica a melhora clínica dos animais, assim como redução da carga parasitária, e não significa a resolução da infecção nos cães. Nogueira et al. (2019) recomendam o tratamento apenas como medida individual e associado sempre ao uso de repelente. Não existem evidências favoráveis ao uso da Miltefosina na LVC como medida de saúde pública.

Quanto aos vetores das leishmanias, um dos principais desafios é a dificuldade operacional para a manutenção das atividades de vigilância entomológica nos municípios e estados. A falta de monitoramento sistematizados das populações de vetores, além da falta de indicadores entomológicos, constitui um importante gargalho para a avaliação da efetividade de medidas de controle vetorial. Adicionalmente, a falta de informações sobre a bionomia de muitas das espécies descritas no país, leva ao desconhecimento do seu papel epidemiológico na transmissão dos agentes das leishmanioses. Com um cenário de mudanças climáticas favorecendo a expansão das espécies vetores, assim como a movimentação de cães infectados, associada ao aumento da migração de humanos, traz à tona a necessidade de estudos sobre a competência e capacidade vetorial de flebotomíneos.

No caso da LV, focos de transmissão têm sido identificados em áreas sem a presença de vetores comprovados, onde espécies que podem ser permissivas parecem manter a transmissão (GALVIS-OVALLOS et al. 2017). Assim, faz-se importante aumentar o conhecimento dos parâmetros de capacidade vetorial de espécies apontadas como vetores suspeitos, e que podem vir a representar importante problema em saúde pública. Adicionalmente, estudos sobre a capacidade vetorial de espécies relacionadas à transmissão de agentes da LT têm sido negligenciados, sendo necessário investir na investigação destes vetores. Outros aspectos importantes, são a falta de recursos humanos qualificados, a fim de realizar atividades básicas de vigilância entomológica, incluindo a identificação de espécies, análise de infecção natural, entre outros, assim como a escassez de recursos operacionais, para realizar monitoramento sistematizado das populações de vetores.

A LT apresenta desafios ainda maiores, considerando os diferentes padrões de transmissão observados no país, relacionados a diversidade de vetores, agentes e hospedeiros. A carência de pesquisas leva ao desconhecimento de vários elementos da

cadeia de transmissão e a dificuldades na elaboração de medidas de controle da LT. A identificação precoce de casos humanos e o adequado tratamento, continuam sendo ainda as principais ferramentas para o controle da LT.

## 4. REFERÊNCIAS

AFONSO, M. M. S.; GOMES, A. C.; MENESES, C. R. V.; RANGEL, E. F. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (N.) intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1816–1820, 2005.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil.** (Tese) Doutorado - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 1959.

ALEXANDER, B.; YOUNG, D. G. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 397–403, 1992.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p.e35671, 2012.

ALVES, E. B.; FIGUEIREDO, F. B.; ROCHA, M. F.; WERNECK, G. L. Operational difficulties in the use of insecticidal dog collars for the control of visceral leishmaniasis, municipality of Montes Claros, MG, Brazil, 2012. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 27, n. 4, p.e2017469, 2018.

ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; SOOSARAEI, M.; HOSSEINI TESHNIZI, S.; MARDANI, A.; BANIMOSTAFAVI, E. S.; ZIAEI HEZARJARIBI, H. Global status of visceral leishmanial infection among blood donors: A systematic review and meta-analysis. **Transfus Apher Sci**, v. 56, n. 5, p. 748–754, 2017.

AZEVEDO, A. C.; RANGEL, E. F.; QUEIROZ, R. G. *Lutzomyia migonei* (França, 1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturité, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 479, 1990.

AZEVEDO, A. C. R.; LUZ, S. L. B.; VILELA, M. L.; RANGEL, E. F. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho municipality, Rondônia state, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 509–512, 1993.

BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, 1986.

BANDARANAYAKE, T.; SHAW, A. C. Host Resistance and Immune Aging. **Clin Geriatr Med**, v. 32, n. 3, p. 415–432, 2016.

BARROS, V. L. L.; REBÊLO, J. M. M.; SILVA, F. S. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de capoeira do município do Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Área de transmissão de leishmaniose. **Cad Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 265–270, 2000.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXAO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 53, n. 1, 2001.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV**. 1ª ed. rev. e ampl., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 109 p., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2ª ed., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 189 p., 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Datasus. **Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>, acesso em 01/04/2020.

CARDIM, M. F.; RODAS, L. A.; DIBO, M. R.; GUIRADO, M. M.; OLIVEIRA, A. M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1999–2011. **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 691–700, 2013.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; WERNECK, G. L.; ROMERO, G. A. S. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? **Braz J Infect Dis**, v. 20, n. 2, p. 119–126, 2016.

CARREIRA, J. C. A.; SILVA, A. V. M.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 5, n. 111, 2012.

CASANOVA, C.; NATAL, D.; SANTOS, F. A. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. **J Med Entomol**, v. 46, n. 1, p. 42–50, 2009.

CAVALCANTE, I. J. M.; VALE, M. R. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Rev Bras Epidemiol**, v. 17, n. 4, p. 911–924, 2014.

CIPA GROUP. **Computer-aided Identification of Phlebotomine Sandflies of America. 1999**. Disponível em <<http://cipa.snv.jussieu.fr>>, acesso em 22/11/2011.

CLOOTS, K.; BURZA, S.; MALAVIYA, P.; HASKER, E.; KANSAL, S.; MOLLETT, G.; et al. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A

comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS Negl Trop Dis**, v.14, n.1, p.e0007995, 2020.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. **Cad Saúde Pública**, v. 11, n. 2, p. 321–324, 1995.

COURA-VITAL, W.; LEAL, G. G. A.; MARQUES, L. A.; PINHEIRO, A. C.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p.e0208613, 2018.

CUTOLO, A. A.; GALVIS-OVALLOS, F.; NEVES, E. S.; SILVA, F. O.; CHESTER, S. T.; FANKHAUSER, B. Repellent efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit Vectors**, v. 11, p.e247, 2018.

DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 40, n. 3, p. 537–541, 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, v.45, p. 419–421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital**, v. 48, n. 1, p. 79–98, 1955.

DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C.; ALVES, M. A.; OSHIRO, E. T.; et al. Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the State of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 491–495, 2010.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**, v. 5, p.e276, 2012.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica. IV: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.** São Paulo, Ed. Edgard Blücher / Ed. Universidade de São Paulo, v. 4, 658 p., 1973.

FURTADO, N. V. R.; GALARDO, A. K. R.; GALARDO, C. D.; FIRMINO V. C.; SANTOS, T. V. Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a hydroelectric system affected area from northern Amazonian Brazil: further insights into the effects of environmental changes on vector ecology. **J Trop Med**, v.2016, p.e 9819723, 2016.

GALATI, E.A.B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas.** Apostila da disciplina bioecologia e identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2019. Disponível em <<http://fsp.usp.br/~egalati>>. Acessado em 30/03/2020.

GALVIS-OVALLOS, F. **Leishmaniose visceral americana: avaliação dos parâmetros da capacidade vetorial de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana do município de Panorama, São Paulo, Brasil.** (Tese) Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

- GALVIS-OVALLOS, F.; DA SILVA, M. D.; BISPO, G. B.; DE OLIVEIRA, A. G.; NETO, JR.; MALAFRONTA, R. D.; GALATI, E. A. B. Canine visceral leishmaniasis in the Metropolitan Area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, p.e2, 2017.
- GALVIS-OVALLOS, F.; CASANOVA, C.; BERGAMASCHI, D. P.; GALATI, E. A. B. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 4, p.e0006333, 2018.
- GARRETT-JONES, C.; SHIDRAWI, G. R. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*: an exercise in epidemiological entomology. **Bull World Health Organ**, v. 40, n. 4, p. 531–545, 1969.
- GOENKA, A.; KOLLMANN, T. R. Development of immunity in early life. **J Infect**, v. 71, n. Suppl 1: 12–S120, 2015.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.
- GUIMARÃES, V. C.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA, J.; VOLFOVA, V.; MYSKOVA, J.; FILHO, S. P.; VOLF, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit Vectors**, v. 9, p.e159, 2016.
- GRIMALDI, G. Jr.; TEVA, A.; DOS SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N.; PINTO, I. D.; FUX, B.; LEITE, G. R.; FALQUETO, A. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p.e0185438, 2017.
- HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **J Infect**, v. 39, n. 2, p. 101–111, 1999.
- HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 11, p. 577–588, 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A.; BAILLY, M.; GUY, M. W.; WILKES, T. J.; GUY, F. M.; et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. **Ann Parasitol Hum Comp**, v. 59, n. 6, p. 555–572, 1984.
- LAINSON, R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Phil Trans R Soc Lond B**, v. 321, p. 389–404, 1988.
- LAINSON R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis—incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**. v. 62, n. 3, p. 385–395, 1968.
- LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 199, n. 1135, p. 309–320, 1977.

- LOPES, E. G. P.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A.; HADDAD, J. P. A.; MOREIRA, E. C. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte–MG, 1993 a 2007. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 62, n. 5, p. 1062–1071, 2010.
- LOPES, E. G.; SEVÁ, A. P.; FERREIRA, F.; NUNES, C. M.; KEID, L. B.; HIRAMOTO, R. M.; et al. Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis, in Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 146, n. 3, p. 401-406, 2018.
- MANSUETO, P.; VITALE, G.; SEIDITA, A.; GUARNERI, F. P.; PEPE, I.; RINOLLO, C.; DI ROSA, S.; RINI, G. B.; CILLARI, E.; DI FEDE, G. Advances in leishmaniasis immunopathogenesis. **Acta Medica Mediterr**, v. 27, p. 7–16, 2011.
- MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; VILELA, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae). **Rev Soc Med Bras Trop**, v. 31, n. 1, p. 51–58, 1998.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.
- MENDES, W. S.; SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. R.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 3, p. 227–231, 2002.
- MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 42–48, 2007.
- MOLINA, R.; LOHSE, J. M.; NIETO, J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. **Vet Ther**, v. 2, n. 3, p.261–267, 2001.
- MONTEIRO, D. C. S.; SOUSA, A. Q.; LIMA, D. M.; FONTES, R. M.; PRACIANO, C. C.; FRUTUOSO, M. S.; et al. *Leishmania infantum* Infection in Blood Donors, Northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 4, p. 739–740, 2016.
- MORENO, J. Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. **Front Vet Sci**, v. 6, n. 168, 2019.
- NOGUEIRA, F. S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, v.12, p.e1, 2019.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS, 2019.
- OPS. Organización Panamericana de La Salud. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS, 2019.
- PINTO, I. S.; SANTOS, C. B.; FERREIRA, A. L.; FALQUETO, A. Richness and diversity of sandflies (Diptera, Psychodidae) in Atlantic rainforest reserve in southeastern Brazil. **J Vector Ecology**, v. 35, n. 2, p. 325–332, 2010.

- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937–954, 2009.
- RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912, em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 395–396, 1984.
- RANGEL, E. F.; SOUZA, N. A.; WERMELINGER, E. D.; BARBOSA, A. F. Estabelecimento de colônia, em laboratório, de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 219–226, 1985.
- REGINA-SILVA, S.; FERES, A. M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DIAS, E. S.; MICHALSKY, É. M.; DE ANDRADE, H. M.; et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p.e2233-9, 2016.
- RÊGO, F. D.; SOUZA, G. D.; DORNELLES, L. F. P.; ANDRADE-FILHO, J. D. Ecology and Molecular Detection of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatida) in Wild-Caught Sand Flies (Psychodidae: Phlebotominae) Collected in Porto Alegre, Rio Grande do Sul: A New Focus of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **J Med Entomol**, v. 56, n. 2, p. 519–525, 2019.
- REBÊLO, J. M. M.; ARAÚJO, J. A. C.; CARVALHO, M. L.; BARROS, V. L. L.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, S. T. Flebotomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão Maranhense, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, n. 3, 1999.
- REISEN, W. K. Estimation of vectorial capacity: Introduction. **Bull Soc Vector Ecol**, v. 14, p.39–40, 1989.
- REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **Int J Parasitol**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.
- RODRIGUEZ, N. E.; LIMA, I. D.; GAUR DIXIT, U.; TURCOTTE, E. A.; LOCKARD, R. D.; BATRA-SHARMA, H.; et al. Epidemiological and Experimental Evidence for Sex-Dependent Differences in the Outcome of *Leishmania infantum* Infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 142–145, 2018.
- ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 3; n. 3, p. 251–262, 2014.
- SALOMÓN, O. D.; FELICIANGELI, M. D.; QUINTANA, M. G.; AFONSO, M. M. S.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 831–846, 2015.
- SAMPAIO, M. J. A. Q.; CAVALCANTI, N. V.; ALVES, J. G. B.; FILHO, M. J. C. F.; CORREIA, J. B. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n. 11, p.e877, 2010.

- SANTOS–SILVA, J.; CARANHA, L.; MOURA SANTOS, F. K.; DOS SANTOS, A. P.; RODRIGUES DA SILVA, L. O.; FERREIRA RANGEL, E. Sand fly (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) abundance and diversity in areas affected by the São Francisco River transposition project in Ceará State, Brazil. **Parasit Vectors**, v. 10, p.e1, 2017.
- SEVÁ, A. P.; OVALLOS, F. G.; AMAKU, M.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E. A. B.; LOPES, E. G.; SOARES, R. M.; FERREIRA, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p.e0160058, 2016.
- SEVÁ, A. P.; MAO, L.; GALVIS-OVALLOS, F.; LIMA, J. M. T.; VALLE, D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.11, n. 2, p.e0005353, 2017.
- SILVA, R. A.; ANDRADE, A. J.; QUINT, B. B.; RAFFOUL, G. E. S.; WERNECK, G. L.; RANGEL, E. F.; et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p.e170377, 2018.
- SILVA, A. C.; GOMES, A. C. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 2, p.187-191, 2001.
- SILVA, S. M.; RABELO, P. F.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; Michalick, M. S. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 174, n. 1–2, p. 150–154, 2010.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian J Exp Biol**, v. 47, n. 6, p. 412–423, 2009.
- SUCEN. **Superintendência de Controle de Endemias**. Leishmaniose Tegumentar Americana. São Paulo, 20/12/2018. Disponível em <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atual>> acesso em 20/04/2019.
- TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. G. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infect Immun**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.
- VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis / Kala Azar. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 26, n. 3, p. 78–82, 2010.
- ZACARIAS, D. A.; ROLÃO, N.; DE PINHO, F. A.; SENE, I.; SILVA, J. C.; PEREIRA, T. C.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Causes and consequences of the *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Trop Med Int Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, 2017.

## LEISHMANIOSE CUTÂNEA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

Sandra Cristina Bezerra de Almeida<sup>1</sup>, Cristiane de Oliveira Cardoso<sup>2</sup>

1. Secretaria de Educação Municipal, Rio Branco –Acre, Brasil;

2. Universidade Federal de Catalão (UFCat), Unidade Especial de Biotecnologia, Catalão-Goiás, Brasil.

### RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa e não contagiosa que apresenta manifestações polimórficas de pele e nas mucosas. Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas dos mosquitos chamados flebotomíneos. Nas florestas Amazônicas a LTA é descrita como uma zoonose de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas), sendo o homem infectado pela doença ao entrar em contato com essas áreas florestais. Devido sua ampla distribuição pelo mundo, as leishmanioses exibem a importância global do problema de saúde pública, tendo em vários países como o Brasil, registrando mais de 90% das leishmanioses cutâneas. No Brasil, há registros de casos no início da década de 1980 (19 estados notificados) e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia. O Estado do Acre, em 2002, apresentou os coeficientes de detecção de novos casos de LTA mais elevados do Brasil, com uma taxa média de 183,3 casos por 100.000 habitantes. O desmatamento é uma das modificações que afetam de forma considerável as populações de vetores, devendo ainda ser considerados relevantes para estudos outros fatores que contribuem com as incidências, como: os sócios demográficos (migrações e densidade populacional), biológicos (ciclo vital dos insetos vetores de agentes infecciosos), médico-sociais (estado imunológico da população efetividade dos sistemas locais de saúde e dos programas específicos de controle de doenças, etc.) e a história da doença no lugar.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose, Amazônia e Fatores ambientais

### ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ATL) is an infectious and non-contagious disease that presents polymorphic manifestations of the skin and mucous membranes. All *Leishmania* species are transmitted by the bite of female mosquitoes called sandflies. In the Amazonian forests, ATL is described as a zoonosis of wild mammals (rodents, marsupials, edentates and primates), with man being infected by the disease when in contact with these forest areas. Due to its wide distribution around the world, leishmaniasis exhibit the global importance of the public health problem, having in several countries like Brazil, registering more than 90% of cutaneous leishmaniasis. In Brazil, there are records of cases in the early 1980s (19 notified states) and, in 2003, all states recorded autochtonia. In 2002, the State

of Acre presented the highest detection rates for new cases of ATL in Brazil, with an average rate of 183.3 cases per 100,000 inhabitants. Deforestation is one of the modifications that considerably affect vector populations, and other factors that contribute to the incidence should also be considered relevant for studies, such as: demographic partners (migrations and population density), biological (life cycle of insect vectors) infectious agents), medico-social (immunological status of the population, effectiveness of local health systems and specific disease control programs, etc.) and the history of the disease in place.

**Keyword:** Leishmaniasis, Amazon and Environmental factors

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa e não contagiosa que apresenta manifestações polimórficas de pele e nas mucosas (MURBACK; FILHO; NASCIMENTO, 2011). Nas florestas amazônicas a LTA é descrita como uma zoonose de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas), sendo o homem infectado pela doença ao entrar em contato com essas áreas (FRANÇA et al., 2009).

As transformações ambientais, causadas por seres humanos, modificam o perfil epidemiológico da leishmaniose, promovendo o aumento das áreas endêmicas e o surgimento de novos focos, em função das espécies de flebotomíneos passarem a resistir às condições adversas, conseguindo explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios, facilitando a transmissão da doença (DA SILVA; CUNHA, 2007). Estudos mostram que a leishmaniose tem significativas incidências no país, especialmente em áreas rurais. Rocha et al. (2015), constatou que as altas incidências nas zonas rurais não se justificam apenas pelo fato de a população exercer atividades agrícolas, mas também pelo fato de suas residências ficarem próximas à borda da floresta ou até mesmo no interior. Guerra, Barbosa e Loureiro (2007), em seu estudo realizado em Manaus- AM reforçam que a proximidade das residências com a floresta amplia a transmissão intra e peridomiciliar, onde os vetores são atraídos pela luz, além de haver uma nova fonte de repasto sanguíneo, anteriormente realizado em animais silvestres.

Vale ressaltar que as populações que residem em zonas rurais acreditam que o desmatamento das florestas é essencial para sua sobrevivência, seja para o preparo do solo para as pastagens, seja para a lavoura. A população desconhece as consequências que o desmatamento pode acarretar (CAMPBELL-LENDRUM; DUJARDIM; QUINTÃO, 2002).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRIA GERAL

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa e não contagiosa que apresenta manifestações polimórficas de pele e nas mucosas (ANVERSA et al., 2018). Nas florestas amazônicas a LTA é descrita como uma zoonose de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas), sendo o homem infectado pela doença ao entrar em contato com essas áreas florestais (BATES; ROGERS, 2004). Existem duas teorias que descrevem a origem do surgimento da leishmania no Brasil: a Teoria de Origem Mediterrânea e a Teoria de Origem Andina. A Teoria Mediterrânea relata que a doença teria sido introduzida por fenícios ou sírios que provavelmente entraram no Nordeste do Brasil na Antiguidade, sendo observados casos de pacientes no Estado da Bahia, com uma doença denominada “botão da Bahia” que era semelhante ao “botão do oriente”. A Teoria Andina se baseia em achados em peças de cerâmica pré-colombiana ou huacos peruanos em 1895 e reforçada pelos documentos do século XVI (ALTAMIRANO-ENCIZO et al., 2003).

No Brasil, a primeira referência existente trata do documento Escrito Pastoral Religioso-Político Geográfico citado no livro de Tello, intitulado “Antiguidade de La Syphilis en el Perú”, que descreve uma viagem realizado pelo Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros, percorrendo as regiões do vale Amazônico de Tabatinga (AM) até o Peru (COSTA, 1992).

### 2.2 PATOGENIA

As leishmanioses se apresentam em duas formas: a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e na leishmaniose visceral americana (LVA). A LTA, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, aliada a resposta imune do hospedeiro e outros fatores, causa uma diversidade de aspectos clínicos, que a classificam ainda em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco-cutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa anérgica (LCDA) e leishmaniose cutânea disseminada bordeline (LCDB) (DESJEUX, 2004).

A LC distingue-se por apresentar uma ou mais lesões, são úlceras com bordas elevadas bem definidas, fundo granuloso, avermelhada, exsudativa, indolores e localizadas nas partes expostas do corpo (SILVEIRA et al., 2008).

A leishmaniose cutânea pode apresentar várias formas clínicas:

- A forma cutânea localizada é uma lesão do tipo úlcera, única ou múltipla, com comprometimento primário da pele, tendendo a cura espontânea e com boa resposta ao tratamento (SCOTT; NOVAIS, 2016);
- A forma disseminada é relativamente rara e pode ser observada em 2% dos casos;
- A forma recidiva cútis: comumente aparece uma lesão na borda da cicatriz por volta de 2 anos de aparente cura, evolui com cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera, a resposta terapêutica é pobre ou ausente (WANDERLEY et al., 2019);
- A forma cutânea difusa é rara, mas grave, e ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014).

A LMC é causada devido à disseminação hematogênica dos parasitas, após anos ou meses da lesão cutânea, provocando destruição progressiva das cartilagens e ossos da face, faringe e laringe (NUNES; YOSHIZAWA; OLIVEIRA, 2011).

A leishmaniose mucosa apresenta-se sob as seguintes formas clínicas:

- Forma mucosa tardia - é a forma mais comum. Pode surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea. Classicamente, está associada às lesões cutâneas múltiplas ou de longa duração, às curas espontâneas ou aos tratamentos insuficientes da LC;
- Forma mucosa de origem indeterminada – quando a LM se apresenta clinicamente isolada, não sendo possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia. Tais formas estariam provavelmente associadas às infecções subclínicas ou a lesões pequenas, não ulceradas, de evolução rápida e que teriam passado despercebidas, sem deixar cicatrizes perceptíveis;
- Forma mucosa concomitante - quando a lesão mucosa ocorre à distância, porém ao mesmo tempo em que a lesão cutânea ativa (não contígua aos orifícios naturais);
- Forma mucosa contígua - ocorre por propagação direta de lesão cutânea, localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aero digestivas. A lesão cutânea poderá encontrar-se em atividade ou cicatrizada na ocasião do diagnóstico;

- Forma mucosa primária - ocorre, eventualmente, pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios e genitais (MOTA; MIRANDA 2011).

A LD ocorre em pacientes considerados anérgicos, com deficiência na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, sendo considerado uma forma clínica rara e grave (SILVEIRA et al., 2008).

A leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* que se multiplica em órgãos do sistema fagocítico mononuclear como baço, fígado e medula óssea (SILVA et al., 2001).

Caracteriza-se dentre várias manifestações clínicas, a febre de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia dentre outras que podem levar o indivíduo a óbito devido à ausência de tratamento (SILVA et al., 2001). É transmitida pelo flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, que predominava nas áreas rurais de clima semiárido, e nos últimos anos nos centros urbanos, tendo como reservatórios o cão e a raposa (AKHOUNDI, et al., 2016).

### 2.3 AGENTE ETIOLÓGICO, RESERVATÓRIO E VETOR

A disseminação da leishmaniose envolve a etiologia de várias espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, podemos encontrar as seguintes espécies descritas como agente etiológico da forma cutânea humana sendo seis do subgênero *Viana* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanesis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1987).

A *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, é a espécie que causa a leishmaniose cutânea e a muco-cutânea. Presente em todas as unidades federativas do Brasil, e outros países da América Central e do Sul. O vetor transmissor pode ser encontrado em áreas peridomésticas e nas florestas primárias, muitas vezes associado à presença de animais domésticos. São várias as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão como o como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei*, *Lu. intermedia* dentre outras (PATZ et al., 2000; GOMES et al., 2009).

A *Leishmania (Viannia) guyanesis*, causa a LC, com inúmeras lesões, e ocasionalmente a LM. Presente ao Norte do rio Amazonas no Brasil, e outros países como

as Guianas, Peru, Equador e Venezuela. O vetor encontra-se em áreas de colonização recente, está associado a presença de desdentados e marsupiais. São transmitidas pelas seguintes espécies de fletobomíneos: *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (GOMES et al., 2009).

A *Leishmania (Viannia) lainsoni*, causa a LC, com pouca frequência, devido ao flebotomíneo *Lu. ubiquitalis* apresentar baixa antropifília. Encontrada na Região Amazônica, tendo como hospedeiro o mamífero *Agouti paca* (paca) (PATZ et al., 2000; GOMES et al., 2009;).

A *Leishmania (Viannia) shawi*, encontrado nos Estados do Amazonas e Pará. Os hospedeiros variam entre vários mamíferos como: macacos, preguiça, quati tendo como vetor a *Lu. whitmani* (PATZ et al., 2000).

A *Leishmania (Viannia) naiffi*, causa a LC e encontrado nos Estados do Amazonas e Pará. Três são as espécies de flebotomíneos que transmitem a leishmaniose: a *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayrozai*, que apresentam alta antropifília. Seu hospedeiro natural é o tatu.

A *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, causa a LC, descrita em um pequeno surto entre soldados no município de Belém Estado do Pará, em floresta primária degradada.

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, causa no homem a LC, LCM, LCDA, podendo ser encontrado em vários Estados do Brasil (Amazonas, Pará, Rondônia, sudoeste do Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás) como em outros países (Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa). Seus reservatórios são marsupiais e roedores. Os flebotomíneos envolvidos na transmissão são *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca*.

Os vetores envolvidos na transmissão da doença são flebotomíneos, que transmitem através da picada de fêmeas infectadas da Ordem: *Díptera*, Subfamília: *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (HOARE; WALLACE, 1966).

## 2.4 CICLO BIOLÓGICO:

Envolve a participação de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os parasitas do gênero *Leishmania* exibem duas formas morfológicas, a forma amastigota e a promastigota. As formas amastigotas são intracelulares obrigatórias, com formato arredondado e com curto flagelo, parasitam as células do Sistema Fagocítico Mononuclear dos hospedeiros vertebrados (homem, animais selvagens e animais domésticos). As

formas promastigotas são extracelulares, fusiformes e com longo flagelo, habitam no trato digestório do inseto vetor (BATES; ROGERS, 2004; BATES, 2007).

## 2.5- EPIDEMIOLOGIA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é considerada uma antroponose na qual integra o conjunto das seis doenças tropicais mais importantes desde a antiguidade à contemporaneidade (SILVA et al., 2014). Estima-se que sua prevalência seja de 350 milhões de pessoas com de risco de contrair a doença em 88 países, sendo 32 deles com notificação compulsória e 72 são países em desenvolvimento, com uma incidência anual das formas tegumentares de 1,5 milhões de novos casos (ALVAR, et al., 2012).

Com uma ampla distribuição pelo mundo, as leishmanioses foram documentadas na África, Europa, Ásia e América (PISCOPO; MALLIA-AZZOPARDI, 2007). O grande número de países endêmicos exibe a importância global do problema, tendo países como Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão registrados mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo, e países como Afeganistão, Brasil, Irã, Arábia Saudita e República Árabe da Síria com registros maiores que 90% das leishmanioses cutâneas (ALVAR, et al., 2012).

No Brasil, a ocorrência de leishmaniose é antiga, tendo registros de casos no início da década de 1980 (19 estados notificados) e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia (BARCELLOS, et al., 2009).

Nos últimos 20 anos, a leishmaniose vem acometendo pessoas de todas as idades e sem distinção de gênero, devido a surtos epidêmicos em várias regiões do país como a Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e na Região Amazônica ocasionado principalmente pelo processo predatório de colonização (SILVA, et al., 2012). Em meados do século 20, foram notificados 107.412 casos de leishmaniose tegumentar no período de 1980 a 1988, com um crescimento significativo de 310.767 casos, de 1989 a 1999 (LIMA, et al., 2002).

Outros dados mostram que no Brasil, de 1988 a 2009, a LTA apresentou coeficiente de detecção de 14,1 casos por 100.000 habitantes, com uma média anual de 26.021 casos registrados, tendo a região norte contribuído com o maior número de casos no período (cerca de 37,3% do total de casos registrados), seguido pela região Centro-Oeste (32,6 casos por 100 mil habitantes) e região Nordeste (16,1 casos por 100 000 habitantes) (ALCÂNTARA; DEMARCHI; ARISTIDES, 2016).

A alta incidência da leishmaniose no Brasil, sua ampla distribuição geográfica, associada à diversidade de aspectos clínicos, que causam lesões desfigurantes e incapacitantes, torna a LTA um grande problema de saúde pública não só no Brasil como também nos países do Novo Mundo (DA-SILVA; CUNHA, 2007). A grande área geográfica do Brasil e as diferenças socioeconômicas da população são desafios enfrentados pelo Ministério da Saúde que vem formulando políticas públicas e estratégias para a solução do problema (SILVA-NUNES et al., 2008).

O Estado do Acre entre os anos de 1992 e 2002 registrou um aumento significativo de casos, tendo a prevalência de LT aumentando de 9,3 casos/10.000 habitantes para 18,6 casos/10.000 habitantes (OLIART-GUZMÁN, et al. 2013). A partir de 2002, apresentou os coeficientes de detecção de novos casos de LTA mais elevados do Brasil, com uma taxa média de 183,3 casos por 100.000 habitantes (SILVA; MUNIZ, 2009). É um dos poucos Estados do Brasil a apresentar fronteira internacional, tendo como países vizinhos o Peru e a Bolívia. Nesses países também há a ocorrência da LTA, e seus habitantes têm livre trânsito no Acre, causando assim, uma grande dificuldade no controle desta endemia. A exemplo disso, o município de Xapuri, localizado no Vale do Acre, vem apresentado nos últimos anos um aumento significativo do número de casos notificados, sendo o município considerado um dos principais focos de leishmaniose, apresentando no ano de 1992 a 1997 uma prevalência de 501,7/10 mil habitantes, e um posterior aumento de 639,6/10mil habitantes nos anos de 2001 a 2006 (BRILHANTE et al., 2017).

## 2.6-FATORES DE RISCO

A LTA apresenta como fatores de risco a urbanização, o desmatamento de áreas para estabelecer novos povoados, o desenvolvimento e a expansão da agricultura com construção de represas para irrigação, garimpos e atividades de extrativismo (SHAW, 2007). Além das mudanças ambientais, outros fatores como o estado imunológico e o fracasso do tratamento, contribuem para a emergência, reanimação e disseminação da doença (FEARNSIDE, 2010).

Dentre os fatores citados, o desmatamento é uma das ameaças que a floresta tropical da Amazônia brasileira vem enfrentando. Essa ameaça que elimina a floresta de forma direta pode ainda neste século destruir toda a floresta se nenhuma medida para impedir for realizada (SACCARO; MATION; SAKOWSKI, 2015). A elevada emissão de gás carbônico, as mudanças dos padrões climáticos e a incidência de doenças, são impactos

resultantes do desmatamento que representam custos elevados seja ambiental, social e econômico (VASCONCELOS; NOVO, 2004).

As principais áreas devastadas no Brasil formam o chamado “arco do desmatamento”, que corresponde com a fronteira agrícola que avança em direção aos estados do Pará, Tocantins, Mato Grosso, Rondônia e Acre (LAURANCE et al., 2001).

A devastação das florestas ocorre por vários motivos: o primeiro é a ocupação das terras por populações não indígenas; o segundo motivo é a expansão das indústrias madeireiras e mineradoras, que contribuem para o aumento da malha viária, possibilitando o acesso maior de fazendeiros e colonos; o terceiro motivo é o avanço de projetos madeireiros e de colonização que estão adentrando o interior da Bacia Amazônica e para finalizar os incêndios promovidos pela população para o manejo das pastagens e/ou áreas para o cultivo (PATZ et al., 2000).

Com o desmatamento, temos a substituição das florestas por plantações agrícolas, pecuária, criação de animais de pequenos portes, assentamentos rurais, ou áreas deixadas abertas. Essas modificações afetam de forma considerável as populações de vetores de parasitas, que podem levar a uma alteração do nicho ecológico, proporcionando aos vetores, proliferação e adaptação ao novo habitat, propagando-se um maior número de reservatórios de infecção (CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014).

A floresta Amazônica é considerada uma das maiores reservas de biodiversidades de espécies no mundo, onde muitos dessas espécies são vetores artrópodes que estão associados a doenças em humanos. Podem ser encontradas nesta floresta pelo menos 190 espécies de arbovírus, sendo que 35 deles são responsáveis por causar doenças humanas.

A destruição das florestas altera os ciclos biológicos desses vetores, causando muitas vezes surtos de endemias, aumentando o número de pessoas infectadas. As principais infecções parasitárias de humanos que sofrem interferência da devastação das florestas são: malária, leishmaniose cutânea e visceral, oncocercose, helmintíase transmitida pelo solo e doença de Chagas (CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014).

O crescente número de casos de LTA está diretamente relacionado com o desmatamento de florestas que vem causando ao longo do tempo surtos desta doença no Brasil. O desmatamento altera o ciclo alimentar dos flebotomíneos que antes realizava sua hematofagia em pequenos roedores e passa a suprir sua necessidade alimentar no homem que se fixa nestas áreas (MARZOCHI; MARZOCHI 1994). Um exemplo da mudança de comportamento do flebotomíneo ocorreu na década de 1970, com a construção da rodovia

Transamazônica, onde foram observados insetos realizando a hematofagia em seres humanos durante o dia, hábito incomum deste vetor (ARAÚJO-FILHO, 1981). Segundo Patz et al. (2000), enfatiza que esta agressão sofrida pelas florestas, modifica a distribuição e o comportamento dos parasitas, vetores e hospedeiros. Esses processos de fragmentação das florestas ao alterarem os nichos colaboram para transmissão das doenças infecciosas (BASANO; CAMARGO, 2004). Em consonância, Parente; Souza e Ribeiro (2012), relata que a execução do desmatamento na Amazônia tem influência significativa na proliferação de doenças infecciosas transmitidas por vetores, por propiciar a formação de novos habitat devido as alterações sofridas no ambiente natural. Ele considera que o desmatamento é um dos condicionantes que impactam negativamente os dados da saúde pública (SILVEIRA et al., 2002). O argumento também foi sustentado em um estudo realizado no Estado do Pará que reforça a hipótese de que o desmatamento interfere no surgimento de doenças parasitárias. Relata-se que o desmatamento para a construção de uma usina hidrelétrica localizada no Rio Curuá-Una, provocou o aparecimento de várias doenças, entre elas a leishmaniose, devido à retirada de grandes áreas da borda da floresta (CASTRO et al., 2002).

Em um estudo realizado no Maranhão, o autor enfatiza que a incidência de casos foi maior em ambientes que sofreram intervenções humanas. A ocorrência havia sido significativa em ambientes próximos a desmatamentos recentes e antigos, fortalecendo a hipótese de proximidade da correlação entre as transformações ambientais e a transmissão de leishmaniose (MARTINS et al., 2004). Vale ressaltar que também a manutenção do número de casos está associada às transformações sofridas pela floresta. Nieves et al. (2014), infere que algumas espécies se adaptam a altos níveis de perturbação antropogênica, resultando em uma abundância dessas espécies, que aumenta a probabilidade de maior risco de transmissão da doença nesses ambientes. Campbell-Lendrum et al. (2001), salienta que se acreditava que o desmatamento levaria a extinção local de algumas espécies transmissoras de leishmaniose, mas verificou-se exatamente o inverso, o desmatamento sem critérios nas últimas décadas, levou a um aumento no número de casos de leishmaniose.

Em um outro estudo, Vora (2008), corrobora com o pressuposto, evidenciando que as alterações ecológicas sofridas pelas florestas, alteram de forma significativa as populações tanto dos patógenos, dos vetores como dos hospedeiros. Tais alterações modificam a epidemiologia das doenças transmitidas por vetores que afligem os seres humanos (SILVA et al., 2012). Dentre essas alterações, o desmatamento é um dos

distúrbios que afetam consideravelmente a dinâmica dos ecossistemas. Essas modificações podem criar nichos ecológicos favorecendo a proliferação de vetores e parasitas, aumentando desta forma a transmissão de várias doenças, como a leishmaniose (ARAÚJO-FILHO, 1981; ALHO, 2012; ROCHA et al., 2015)

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns estudos destacam que em países com clima tropical há uma maior frequência de doenças transmitidas por vetores. Essas incidências estariam diretamente relacionadas a fatores ambientais (temperatura, clima, umidade, padrões de uso do solo e de vegetação). Deve-se avaliar outros condicionantes que possam implicar na incidência da leishmaniose como: os sóciodemográficos (migrações e densidade populacional), biológicos (ciclo vital dos insetos vetores de agentes infecciosos), médico-sociais (estado imunológico da população efetividade dos sistemas locais de saúde, dos programas específicos de controle de doenças, etc.) e a história da doença no lugar.

### 4. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO D.I. A Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.3, p.1-40, 2016.

ALCÂNTARA, L.R.S.; DEMARCHI, I.G.; ARISTIDES, S.M.A. Evolution of American Tegumentary Leishmaniasis cases reported in Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.58, n.67, p.1-7.2016.

ALHO, C.J.R. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos Avançados**, v.26, n. 74, p.151-165, 2012.

ALTAMIRANO-ENCISO, A.J.; MARZOCHI, M.C.A.; MOREIRA, J.S.; SCHUBACH, A. O. ; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciência, Saúde**, v. 10, n.3, p. 853-82, 2003.

ALVAR J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.,; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN J.; BOER M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n.5, p.1-12. 2012.

ANVERSA L; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA,V.B.; RAMIREZ, L.E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.64, n.3, p.281-289, 2018.

ARAUJO- FILHO, N. A Leishmaniose Tegumentar Americana e o desmatamento da Amazônia; Universidade do Amazonas, Manaus; **Acta Amazonica**, v.11, n.1, p.187-189, 1981.

BARCELLOS, C.; MONTEIRO, A.M.V.; CORVALÁN, C.; GURGEL H.C.; CARVALHO M.S.; ARTAXO P.; HACCON S.; RAGONI V. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.18, n.3, p.285-304, 2009.

BASANO, A.S.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p.328-337, 2004.

BATES, P. A; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**, v.4, n.6, p.601-9, 2004.

BATES, P.A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v.37, n.10, p.1097-106, 2007.

BRILHANTE, A.F.; MELCHIOR, L.A.K.; NUNES, V.L.B.; CARDOSO, C.O.; GALATI, E.A. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia, **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.59, n.12, p.1-9, 2017.

CAMPBELL-LENDRUM, D.; DUJARDIN,J.P.; MARTINEZ, E. et al . Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 159-162, 2001.

CASTRO, E.A.; SOCCOL, V.T.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.5, p. 445-452, 2002.

CONFALONIERI, U.E.C.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A.F. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Tropica**, v.129, p.33– 41, 2014.

COSTA, J.M.L. Leishmaniose tegumentar americana: Origens e histórico no Brasil. **Acta Amazonica**, v. 22, n.1, p. 71 – 77, 1992.

DA-SILVA, L.M.R.; CUNHA, P.R. A urbanização da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Campinas – São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.6, p.515-9, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

FEARNSIDE, P.M. Consequências do desmatamento da Amazônia. **Scientific American Brasil - Especial Biodiversidade**, p. 54-59, 2010.

FRANÇA, E.L.; MANDDADORI, M.N.; FRANÇA, J.L.; BOTELHO, ACF; FERRARI, C.K.B.; HONÓRIO-FRANÇA A.C. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose tegumentar americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 103-107, 2009.

GOMES, L.H.M.; NERY, L.C.R.; PINHEIRO, F. G.; FREITAS R.A.; FRANCO A.M.R. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em terra firme e planície fluvial na área de influência do gasoduto Coari-Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 39, n. 1, p.233-236, 2009.

GUERRA, J.A.O.; BARBOSA, M.G.V.; LOUREIRO, A.C.S.P.; LOUREIRO, A.C.S.P.; COELHO, C.P.; ROSA, G.G.; COELHO, L.I.A.C.R. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.9, p.2215-2223, 2007.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.C. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v.212, n.5068, p.1385-1386, 1966.

LAINSON R, SHAW J. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, Biology and Epidemiology. London: Academic Press, v.1, p.1-120.1987.

LAURANCE, W.F.; COCHRANE, M.A.; BERGEN, S.; FEAMSIDE P.M.; DELAMONICA P.; BARBER C.; D'ANGELO S.; FERNANDES T. The future of the Brazilian Amazon. **Science**, v. 291, p.438-9, 2001.

LIMA, A.P.; MINELLI L.; TEODORO, U.; COMUNELLO, E. Distribuição da leishmaniose tegumentar por imagens de sensoriamento remoto orbital, no Estado do Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.77, n. 7, p.681-692, 2002.

MARTINS, L.M.; REBÊLO, J.M.M.; SANTOS, M.C.F.V.; COSTA J.M.L.; SILVA A.R.; FERREIRA L.A. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n. 3, p.735-743, 2004.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v.10,n. supl.2, p. 359-375,1994.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R.R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v.15, n.3, p. 376-381, 2011.

MURBACK, N.D.N.; FILHO, G.H.; NASCIMENTO, R,A,F.; et al Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário

de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.1, p.55-63, 2011.

NIEVES, E.; ORAÁ, L.; RONDÓN, Y.; SÁNCHEZ Y.; ROJAS M.; RONDÓN M.; RUJANO M. GONZÁLES N.; CAZORLA D. Effect of environmental disturbance on the population of sandflies and leishmania transmission in an endemic area of Venezuela. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, p.1-7, 2014.

NUNES, C.S.; YOSHIZAWA, J.K.; OLIVEIRA, R.Z.; et al. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v.6, n.18, p.52-56, 2011.

OLIART-GUZMÁN, H.; MARTINS, A.C.; MANTOVANI A.S.S.; BRAÑA A.T.; DELFINO B.M.; PEREIRA T.M.; et al. Características epidemiológicas da Leishmaniose tegumentar americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n.2, p.187-200, 2013.

PARENTE, A.T.; SOUZA, E. B.; RIBEIRO, J.B.M. A ocorrência de malária em quatro municípios do estado do Pará, de 1988 a 2005, e sua relação com o desmatamento. **Acta Amazonica**. v. 42, n. 1, p.41 – 48, 2012.

PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p.1395-1405, 2000.

PISCOPO, T.V.; MALLIA- AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Postgrad Medicinal Journal**, v.82, p.649-57, 2006.

ROCHA, T.J.M.; SANTANA E.P.C.; BARBOSA A.C.A.; CALHEIROS C.M.L. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan - Amazônica de Saúde**, v.6, n.4, p.49-54, 2015.

SACCARO, N.L.; MATION, L.F.; SAKOWSKI, P.A.M. **Impacto do desmatamento sobre a incidência de doenças na Amazônia**, Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), n. 2142, 2015.

SCOTT, P., NOVAIS, F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v.16,n.9, p.581–592, 2016.

SHAW, J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A minireview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n.5, p.541-547, 2007.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL ,R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p.285-91, 2001.

SILVA-NUNES, M.; CAVASINI, C.E.; SILVA, N.S.; GALATI, E.A.B. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.11, n.2, p.241-251, 2008.

SILVA, N.S.; MUNIZ, V.D. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. **Caderno de Saúde Pública**, v.25, n.6, p.1325-36, 2009.

SILVA, P.L.N.; VERSIANI, C.M.C.; CHAGAS, R.B.; ROCHA R.G.; MAJUSTE R.; SILVA J.S. Estudo da leishmaniose tegumentar americana na cidade de Montes Claros/MG: aspectos epidemiológico, clínico e terapêutico. **Journal of Health Sciences Institute**, v.32, n.1, p.38-42, 2014.

SILVA, R.A.; MERCADO, V.T.C.; HENRIQUE, L.F.; CLARAVOLO R.M.C.; WANDERLEY D.M.V. Magnitude e tendência da Leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v.15, n.3, p. 617-26, 2012.

SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.Y.; DE SOUZA, A.A.A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brazil, caused by *Leishmania (viannia) undenbergi* n. Sp. A new leishmanial parasite of man in the amazon region. **Parasite**, v.9, p.43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T.; MÜLLER, S.R.; SOUZA, A.A.A. ; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M.D; CORBETT, C.E.P. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana amazônica, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v.22, n.1, p. 9-20 , 2008.

WANDERLEY, J.L.M.; DEOLINDO, P.; CARLSEN ERIC, PORTUGAL,A.B. BERNARDO, DAMATTA R.A.; BARCINSKI, A.M.; LYNN,S. CD4+ T Cell-Dependent Macrophage Activation Modulates Sustained PS Exposure on Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology**, v.9, n.105, p.1-13, 2019.

VASCONCELOS, C.H.; NOVO, E.M.L.M. Mapeamento do uso e cobertura da terra a partir da segmentação e classificação de imagens – fração solo, sombra e vegetação derivadas do modelo linear de mistura aplicado a dados do sensor TM/Landsat5, na região do reservatório de Tucuruí - PA. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 487 – 493, 2004

VORA, N. Impact of Anthropogenic Environmental Alterations on Vector-Borne Diseases. **Medscape Journal of Medicine**, v.10, n.10, 2008.

## PANORAMA ATUAL DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL: UMA MINI-REVISÃO

Yago Visinho dos Reis<sup>1</sup>, Mara Cristina Pinto<sup>2</sup>, Kaio Cesar Chaboli Alevi<sup>1,2</sup>

1. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biotecnologia de Botucatu, Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Júnior, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil;  
2. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

### RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidos por insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae. A leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum*, tem como principal vetor na América Latina a espécie *Lutzomyia longipalpis*. Já a leishmaniose tegumentar (LT) é causada, principalmente, pelos protozoários *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (L.) amazonensis* e pode ser transmitida por diversas espécies de flebotomíneos. Nos últimos 20 anos, mais de 50 mil casos autóctones de LV e 350 mil casos de LT foram registrados no Brasil. No estado de São Paulo, o vetor da LV foi registrado em área urbana no município de Araçatuba, em 1997, seguido por casos autóctones de LV canina e humana, que resultaram em mais de três mil casos e 266 mortes de LV até o momento. Por outro lado, embora o número de casos de LT no estado de São Paulo seja três vezes maior que de LV e existam diversas espécies vetoras, o número de óbitos associados com a LT é de apenas 16 casos. O presente capítulo trata-se de uma mini-revisão que agrega informações associadas ao panorama atual das leishmanioses no estado de São Paulo. Diante dos dados agrupados, ressaltamos a importância de ações voltadas ao controle das leishmanioses e dos seus vetores.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral, Leishmaniose Tegumentar e Phlebotominae.

### ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by hematophagous insects of the subfamily Phlebotominae. Visceral leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania (Leishmania) infantum*, and *Lutzomyia longipalpis* is the main vector in Latin America. Legumentary leishmaniasis (LT) is caused mainly by *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* and *Le. (L.) amazonensis* and is transmitted by several species of sandflies. For the past 20 years, more than 50 thousand autochthonous cases of VL and 350 thousand cases of LT have been registered in Brazil. In the São Paulo state, the VL vector was recorded in an urban area in the municipality of Araçatuba, in 1997, followed by autochthonous cases of canine and human VL, which resulted in more than three thousand cases and 266 VL deaths so far. On the other hand, although the number of

cases of TL in São Paulo state is three times greater than that of VL and there are several vector species, the number of deaths associated with TL is only 16 cases. This chapter is a mini-review that aggregates information associated with the current panorama of leishmaniasis in the São Paulo state. In view of the grouped data, we emphasize the importance of actions aimed to the leishmaniasis control and of the vectors.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, Tegumentary leishmaniasis and Phlebotominae.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum*, tem como principal vetor na América Latina a espécie *Lutzomyia longipalpis* (SOARES; TURCO, 2003; SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017). No período de 2001 a 2018, 65.585 novos casos foram registrados no Brasil, sendo 54.429 confirmados como autóctones (SINAN, 2020). A região Nordeste apresentou maior número de casos, seguida pelo Sudeste e Norte (ANDRADE-FILHO et al., 2017). Embora *Lu. longipalpis* seja a principal espécie vetora de *Le. (L.) infantum*, as espécies *Lu. cruzi* (SANTOS et al., 1998, MISSAWA et al., 2011) e *Migonomys migonei* (CARVALHO et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2016) também são vetoras, enquanto *Pintomyia fischeri* apresenta-se como um potencial vetor (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Dentre o material utilizado para a descrição da espécie *Lu. longipalpis*, contavam espécimes coletados na capital do estado de São Paulo (LUTZ; NEIVA, 1912). No entanto, esse flebotomíneo só foi coletado novamente no estado, no município de Salto de Pirapora, 58 anos depois, por Forattini et al. (1970), o que levou alguns autores a questionarem a procedência das espécies coletadas por Lutz; Neiva (1912) e, até mesmo, desconsiderá-la (BARRETO, 1947, 1950). Em 1997, Costa et al. (1997) notificaram o primeiro registro da presença desse vetor em área urbana do município de Araçatuba, São Paulo. Esse registro foi seguido dos primeiros casos autóctones de LV canina e humana, respectivamente, nos anos de 1998 e 1999, no estado, ambos no município de Araçatuba (CAMARGO-NEVES et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2016).

Já a leishmaniose tegumentar (LT) é causada, principalmente, pelos protozoários *Le. (Viannia) braziliensis*, *Le. (V.) guyanensis* e *Le. (L.) amazonensis* (ANVERSA et al., 2018), os quais podem ser veiculados por diversas espécies de flebotomíneos. Entre 2001 e 2018, o Brasil apresentou 429.203 casos de LT, sendo 365.675 deles confirmados como autóctones (SINAN, 2020). No estado de São Paulo, a LT está relatada desde 1884

(SILVEIRA, 1919) e é causada, principalmente, pela *Le. (V.) braziliensis*, sendo as principais espécies transmissoras, *Nyssomyia intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Mi. migonei* e *Pi. pessoai* (MARCONDES, 1996; CAMARGO-NEVES; GOMES; ANTUNES, 2002; ANDRADE-FILHO; GALATI; FALCÃO, 2007; SHIMABUKURO et al., 2010).

Tratando-se de doenças transmitidas principalmente por vetores, uma das formas de profilaxia das leishmanioses é reduzir o contato dos seres humanos com os insetos transmissores. Para isso, diversas estratégias podem ser empregadas: aplicação de repelentes durante a exposição em áreas de risco, evitar a permanência em áreas com atividade vetorial do anoitecer ao amanhecer, bem como utilização de mosquiteiros de malha fina e vedação de frestas em portas e janelas (OPAS, 2019). Além disso, estratégias para diminuir a população de vetores também são extremamente importantes, como manter pátios e terrenos limpos, armazenar resíduos orgânicos em locais adequados e realizar a poda de árvores para aumento da incidência solar no solo, o que diminui as condições favoráveis para o desenvolvimento do vetor (OPAS, 2019).

No Brasil, como medida profilática, o Decreto nº 51.838/1963 prevê que todos os cães infectados com LV sejam eutanasiados (BRASIL, 1963), uma vez que em áreas urbanizadas eles são os principais reservatórios domésticos para a leishmaniose visceral (RIBEIRO et al., 2018). Além disso, a Portaria nº 1.426/2008, do Ministério da Saúde, reforça que os casos de LV em cães não podem ser tratados com medicamentos de uso humano ou não registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (SAÚDE, 2008). Dessa forma, apenas a partir de 2016, com o registro pelo MAPA do medicamento Milteforan™ da Virbac (MAPA, 2016), o tratamento da LV nos cães foi regulamentado. Vale ressaltar que ele não promove a cura parasitológica dos cães, somente a cura clínica, mas diminui a parasitemia e, com isso, a probabilidade de transmitir o parasito para os vetores (VIRBAC, 2020). Ressalta-se, ainda, a necessidade de acompanhamento periódico com o médico veterinário para avaliação da eficácia do tratamento (VIRBAC, 2020).

Alguns estudos mostraram que o diagnóstico clínico da LV em cães pode não ser claro. Por exemplo, em algumas amostras de cães, provenientes da cidade de Araçatuba, São Paulo, que manifestavam sintomas de LV, o parasito que foi identificado era da espécie *Le. (L.) amazonensis*, causadora de LT em humanos e não da LV (TOLEZANO et al., 2007). Em Bauru, São Paulo, Sanches et al. (2016) também verificaram, a partir de um grupo amostral de 103 cães, que cerca de 75% deles, diagnosticados com LV e que foram

submetidos à eutanásia, estavam infectados com *Le. (L.) amazonensis* e não com *Le. (L.) infantum*.

A complexidade epidemiológica envolvida nas leishmanioses, a falta de alternativas de medicamentos para seres humanos e cães, a ausência de vacinas efetivas, e os problemas com o diagnóstico são alguns dos entraves para o enfrentamento dessa enfermidade. Com base nisso, o presente capítulo apresenta uma mini-revisão que agrega informações associadas ao panorama atual das leishmanioses no estado de São Paulo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PANORAMA ATUAL DA LV NO ESTADO DE SÃO PAULO

**Agente etiológico:** *Le. (L.) infantum*.

**Formas de transmissão:** Principalmente por *Lu. longipalpis*, mas, em regiões com casos da doença onde essa espécie não foi encontrada, é possível que outras espécies estejam atuando como vetoras, como *Mi. migonei*, *Pi. fischeri* e *Ny. intermedia* (RANGEL et al., 2019).

**Número de casos autóctones:** No período de 1999 a 2019, foram registrados 3.040 casos de LV no estado de São Paulo, com 266 mortes (CVE, 2020b).

**Distribuição da LV:** O último levantamento realizado, com dados até 2018, aponta que existem, 158 municípios paulistas com transmissão de LV, sendo 97 com casos humanos e caninos autóctones, além de 55 com apenas casos caninos (OLIVEIRA et al., 2019). No entanto, Oliveira et al. (2016) destacam que o número de municípios com a presença de casos de LV canina e humana apresenta uma taxa de crescimento anual constante, sendo que, a cada ano, aproximadamente seis municípios poderão registrar casos de LV canina e quatro de LV humana.

**Distribuição dos vetores:** A espécie *Lu. longipalpis* já foi notificada em 202 municípios do estado de São Paulo, estando presente em 151 dos municípios com transmissão confirmada (OLIVEIRA et al., 2019). Dessa forma, ainda existem 51 municípios com a presença do vetor, mas que ainda não apresentaram casos autóctones de LV (OLIVEIRA et al., 2019). Vale ressaltar que o número de municípios com a presença de *Lu. longipalpis*

apresenta uma taxa de crescimento anual constante, sendo que, a cada ano, aproximadamente 10 novos municípios poderão apresentar o vetor (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso, as outras espécies de flebotomíneos com potencial de transmissão, como *Pi. fischeri* e *Mi. migonei*, também apresentam ampla distribuição no estado, ocorrendo em 122 e 108 municípios paulistas, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) que ocorrem no estado de São Paulo.

| <b>Espécie</b>   | <b>Nº de municípios com ocorrência</b> |
|--|--|
| <i>Bichromomyia flaviscutellata</i> (Mangabeira, 1942)           | 2                                      |
| <i>Brumptomyia avellari</i> (Costa Lima, 1932)                   | 9                                      |
| <i>Brumptomyia bragai</i> Mangabeira e Sherlock, 1961            | 2                                      |
| <i>Brumptomyia brumpti</i> (Larrousse, 1920)                     | 22                                     |
| <i>Brumptomyia cardosoi</i> (Barretto e Coutinho, 1941)          | 4                                      |
| <i>Brumptomyia carvalhoi</i> Shimabukuro, Marassá e Galati, 2007 | 2                                      |
| <i>Brumptomyia cunhai</i> (Mangabeira, 1942)                     | 6                                      |
| <i>Brumptomyia guimaraesi</i> (Coutinho e Barretto, 1941)        | 5                                      |
| <i>Brumptomyia mangabeirai</i> (Barretto e Coutinho, 1941)       | 4                                      |
| <i>Brumptomyia nitzulescui</i> (Costa Lima, 1932)                | 12                                     |
| <i>Brumptomyia ortizi</i> Martins, Silva e Falcão, 1971          | 1                                      |
| <i>Brumptomyia pinto</i> (Costa Lima, 1932)                      | 3                                      |
| <i>Brumptomyia troglodytes</i> (Lutz, 1922)                      | 5                                      |
| <i>Evandromyia bourrouli</i> (Barretto e Coutinho, 1941)         | 1                                      |
| <i>Evandromyia carmelinoi</i> (Ryan et al., 1986)                | 1                                      |
| <i>Evandromyia correalimai</i> (Martins, Coutinho e Luz, 1970)   | 2                                      |
| <i>Evandromyia cortelezii</i> (Brèthes, 1923)                    | 13                                     |
| <i>Evandromyia edwardsi</i> (Mangabeira, 1941)                   | 14                                     |
| <i>Evandromyia lenti</i> (Mangabeira, 1938)                      | 6                                      |
| <i>Evandromyia petropolitana</i> (Martins e Silva, 1968)         | 4                                      |
| <i>Evandromyia rupicola</i> (Martins, Godoy e Silva, 1962)       | Não especificado                       |
| <i>Evandromyia sallesi</i> (Galvão e Coutinho, 1939)             | 6                                      |
| <i>Evandromyia termitophila</i> (Martins, Falcão e Silva, 1964)  | 4                                      |

|  |                  |
|--|------------------|
| <i>Expapillata firmatoi</i> (Barretto, Martins e Pellegrino, 1956)     | 30               |
| <i>Lutzomyia almerioi</i> Galati e Nunes, 1999                         | Não especificado |
| <i>Lutzomyia amarali</i> (Barretto e Coutinho, 1940)                   | 5                |
| <i>Lutzomyia castroi</i> (Barretto e Coutinho, 1941)                   | 1                |
| <i>Lutzomyia dispar</i> Martins e Silva, 1963                          | 2                |
| <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz e Neiva, 1912)                      | 29               |
| <i>Martinsmyia alphabetica</i> (Fonseca, 1936)                         | 15               |
| <i>Micropygomyia longipennis</i> (Barretto, 1946)                      | 3                |
| <i>Micropygomyia petari</i> Galati, Marassá e Andrade, 2003            | 2                |
| <i>Micropygomyia quinquefer</i> (Dyar, 1929)                           | Não especificado |
| <i>Micropygomyia schreiberi</i> (Martins, Falcão e Silva, 1975)        | 2                |
| <i>Micropygomyia ferreirana</i> (Barretto, Martins e Pellegrino, 1956) | 8                |
| <i>Migonemyia bursiformis</i> (Floch e Abonnenc, 1944)                 | 1                |
| <i>Migonemyia migonei</i> (França, 1920)                               | 108              |
| <i>Migonemyia rabelloi</i> (Galati e Gomes 1992)                       | 5                |
| <i>Migonemyia vaniae</i> Galati, Fonseca e Marassá, 2007               | 1                |
| <i>Nyssomyia intermedia</i> (Lutz e Neiva, 1912)                       | 15               |
| <i>Nyssomyia neivai</i> (Pinto, 1926)                                  | 42               |
| <i>Nyssomyia singularis</i> (Costa Lima, 1932)                         | 1                |
| <i>Nyssomyia whitmani</i> (Antunes e Coutinho, 1939)                   | 106              |
| <i>Pintomyia bianchigalatae</i> (Andrade-Filho et al. 1999)            | 1                |
| <i>Pintomyia christenseni</i> (Young e Duncan, 1994)                   | Não especificado |
| <i>Pintomyia fischeri</i> (Pinto, 1926)                                | 122              |
| <i>Pintomyia misionensis</i> (Castro, 1959)                            | 10               |
| <i>Pintomyia monticola</i> (Costa Lima, 1932)                          | 41               |
| <i>Pintomyia pessoai</i> (Coutinho e Barretto, 1940)                   | 71               |
| <i>Pressatia choti</i> (Floch e Abonnenc, 1941)                        | 1                |
| <i>Pressatia trispinosa</i> (Mangabeira, 1942)                         | 1                |
| <i>Psathyromyia aragaoi</i> (Costa Lima, 1932)                         | 3                |
| <i>Psathyromyia brasiliensis</i> (Costa Lima, 1932)                    | 3                |
| <i>Psathyromyia hermanlenti</i> (Martins, Silva e Falcão, 1970)        | 1                |
| <i>Psathyromyia lanei</i> (Barretto e Coutinho, 1941)                  | 13               |
| <i>Psathyromyia lutziana</i> (Costa Lima, 1932)                        | 2                |

|   |                  |
|---|------------------|
| <i>Psathyromyia pascalei</i> (Coutinho e Barretto, 1940)      | 16               |
| <i>Psathyromyia pelli</i> (Sherlock e Alencar, 1959)          | 3                |
| <i>Psathyromyia pestana</i> (Barretto e Coutinho, 1941)       | 12               |
| <i>Psathyromyia punctigeniculata</i> (Floch e Abonnenc, 1944) | 1                |
| <i>Psathyromyia shannoni</i> (Dyar, 1929)                     | 40               |
| <i>Psychodopygus arthuri</i> (Fonseca, 1936)                  | 19               |
| <i>Psychodopygus ayrozai</i> (Barretto e Coutinho, 1940)      | 15               |
| <i>Psychodopygus geniculatus</i> (Mangabeira, 1941)           | 9                |
| <i>Psychodopygus hirsutus</i> (Mangabeira, 1942)              | Não especificado |
| <i>Psychodopygus lloydi</i> (Antunes, 1937)                   | 16               |
| <i>Sciopemyia microps</i> (Mangabeira, 1942)                  | 5                |
| <i>Sciopemyia sordellii</i> (Shannon e Del Ponte, 1927)       | 3                |

---

Fonte: Elaborada pelos autores com base em Shimabukuro; Galati (2011).

## 2.2 *Lutzomyia longipalpis* – SUA IMPORTÂNCIA E COMPLEXIDADE NA LV

A expansão da LV para áreas urbanizadas no Brasil, já bem documentada desde a década de 80, tem causas múltiplas e complexas que envolvem o parasito e o vetor (WERNECK, 2008) sendo que, a dispersão de *Lu. longipalpis*, de maneira ativa ou passiva, parece ser um ponto fundamental nesse cenário (BRAZIL, 2013). Ressalta-se que, o fato de *Lu. longipalpis* ser um complexo de espécies confere-lhe um caráter de heterogeneidade fisiológica e comportamental (SOUZA; BRAZIL; ARAKI, 2017).

As primeiras evidências de divergências dentro da espécie foram observadas por Mangabeira-Filho (1969), que mostraram diferenças fenotípicas e ecológicas entre populações de *Lu. longipalpis* do Ceará e do Pará. Posteriormente, por meio de cruzamentos experimentais, verificou-se a existência de barreiras de isolamento reprodutivo entre diversas populações de *Lu. longipalpis* (WARD et al., 1983; LANZARO et al., 1993; SOUZA et al., 2008). Aliado a isso, outras divergências também corroboram o *status* de complexo de espécies, como por exemplo, análise da eletroforese de isoenzimas (LANZARO et al., 1993), bem como as características citogenéticas (YIN et al., 1999) e as diferenças no padrão morfométrico das asas (DUJARDIN et al., 1997). Outra diferença importante é a quantidade da proteína maxadilina presente na saliva das espécies de *Lu. longipalpis* (WARBURG et al., 1994) e as diferenças genéticas dessa proteína (LANZARO

et al., 1999), uma vez que ela pode apresentar ação moduladora da resposta imune no local de picada, facilitando a infecção (LANZARO et al., 1999). A identificação de cinco quimiotipos de feromônios sexuais em machos é, também, uma característica diferenciada entre as populações de *Lu. longipalpis*, sendo 9-metilgermacreno-B, 3-metil- $\alpha$ -himacaleno, cembreno-1, cembreno-2 e sobraleno os feromônios identificados até o momento (SPIEGEL et al., 2016; PALFRAMAN et al., 2018).

Embora todas as características mencionadas acima suportem que *Lu. longipalpis* seja um complexo formado por, pelo menos, sete espécies (ARAKI et al., 2009), a dificuldade de determinar características fenotípicas para diferenciar os táxons que compõem esse complexo é o principal problema que impede a descrição formal das espécies crípticas de *Lu. longipalpis*, uma vez que o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999) destaca a necessidade de estabelecer caracteres fenotípicos para a diagnose das diferentes espécies.

Do ponto de vista epidemiológico, essas diferenças são extremamente importantes, pois as espécies do complexo *Lu. longipalpis* podem apresentar capacidades vetoriais diferentes. No estado de São Paulo, as diferenças ecológicas apresentadas entre populações de *Lu. longipalpis* foram relacionadas a padrões divergentes de transmissão da LV. A cidade de Araçatuba, localizada na região noroeste do estado, apresenta, desde 1999, casos de LV em humanos, enquanto no município de Espírito Santo do Pinhal, localizada no nordeste do estado, não existem casos da doença em humanos, embora exista *Lu. longipalpis*. Análises dos feromônios sexuais entre os machos das suas populações apontaram que em Araçatuba o feromônio presente é o 9-metilgermacreno-B, enquanto em Espírito Santo do Pinhal o feromônio identificado foi cembreno-1 (CASANOVA et al., 2006). Essa indicação foi claramente reforçada em um estudo mais amplo no estado de São Paulo onde se avaliou a presença de casos caninos, humanos e os feromônios nas diferentes populações de *Lu. longipalpis* e observou-se dois modelos epidemiológicos de transmissão distintos: áreas com casos humanos de LV e alta prevalência canina, em que as populações do vetor apresentaram o feromônio 9-metilgermacreno-B, contrastando com o feromônio cembreno-1, identificado em áreas sem o registro de casos humanos da doença e com baixa prevalência canina (CASANOVA et al., 2015).

### 2.3. PANORAMA ATUAL DA LT NO ESTADO DE SÃO PAULO

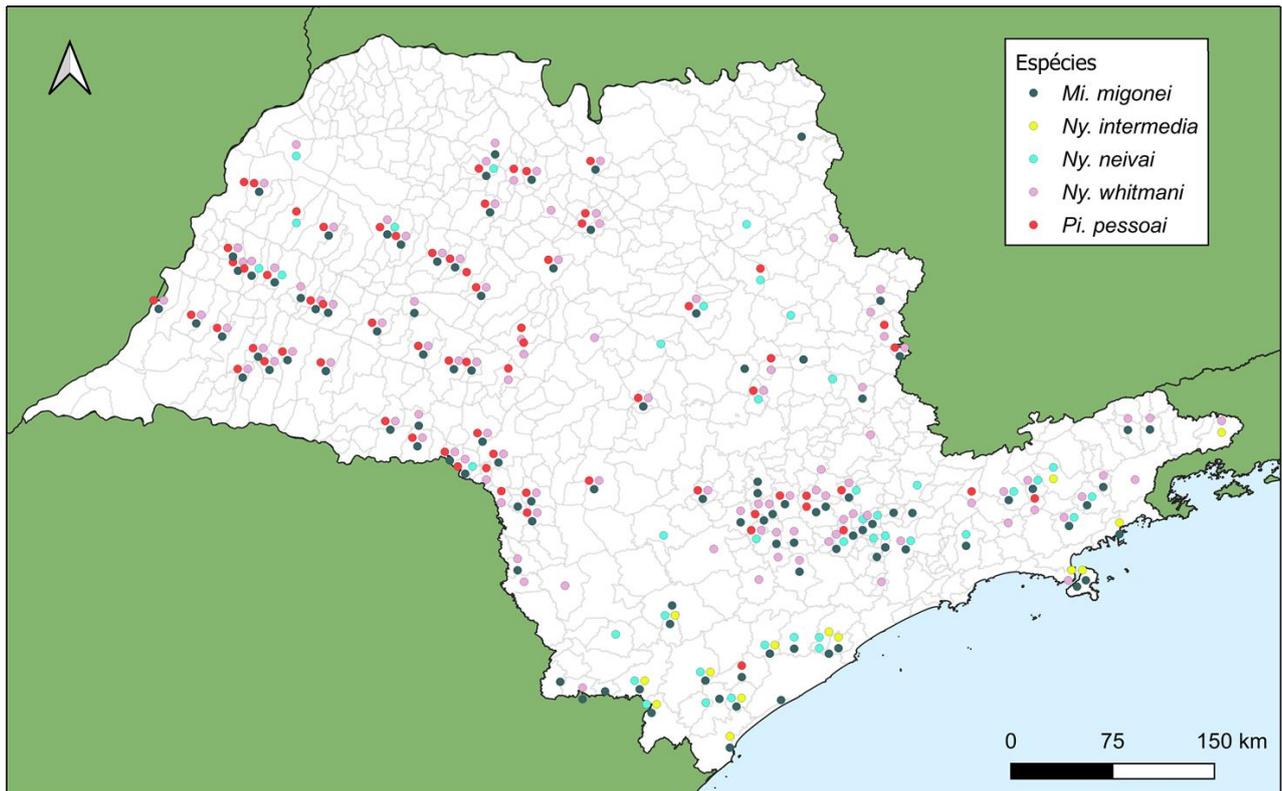
**Agentes etiológicos:** Causada principalmente por *Le. (V.) braziliensis* (TOLEZANO et al., 1988), mas também pode ser causada por *Le. (L.) amazonensis*, a qual já foi identificada em pacientes com LT de Ribeirão Preto (MEDEIROS; SILVA; ROSELINO, 2008), e também em cães de Araçatuba (TOLEZANO et al., 2007) e Bauru (SANCHES et al., 2016).

**Forma(s) de transmissão:** As principais espécies transmissoras da LT no estado de São Paulo são *Ny. intermedia*, *Ny. neivai*, *Ny. whitmani*, *Mi. migonei* e *Pi. pessoai* (MARCONDES, 1996; CAMARGO-NEVES; GOMES; ANTUNES, 2002; ANDRADE-FILHO; GALATI; FALCÃO, 2007).

**Número de casos autóctones:** De acordo com os dados obtidos pela Secretaria da Saúde de São Paulo, 10.821 casos de LT foram registrados no estado no período de 1998 a 2020 (CVE, 2020a), acarretando em 16 mortes (SINAN, 2020). Entretanto, em cerca de 50% dos casos, os municípios não foram determinados (podendo não ter sido informado, ignorado ou ser pertencente a outros estados) (CVE, 2020a).

**Distribuição da LT:** Os maiores números de casos reportados de 2007 a 2020, de acordo com a Secretaria da Saúde de São Paulo, se concentraram nos Grupos de Vigilância Epidemiológica (Tabela 2) de Registro (676 casos), Sorocaba (255), Campinas (213), Itapeva (182) Presidente Venceslau (170), Ribeirão Preto (164), Caraguatatuba (142), Marília (127), Piracicaba (112) e Araçatuba (107) (CVE, 2020a).

**Distribuição dos vetores:** De acordo com a revisão de Shimabukuro; Galati (2011), os vetores da LT apresentam ampla distribuição em diversos municípios paulistas (Tabela 1). Até 2010, *Mi. migonei* estava presente em 108 municípios, *Ny. whitmani* em 106, *Pi. pessoai* em 71, *Ny. neivai* em 42 e *Ny. intermedia* em 15 (Figura 1) (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).



**Figura 4** - Mapa da distribuição dos vetores da LT no estado de São Paulo.

Fonte: Elaborada pelos autores com base em Shimabukuro; Galati (2011).

**Tabela 2.** Municípios integrantes dos GVEs (Grupos de Vigilância Epidemiológica) com maiores números de casos reportados, no período de 2007 a 2020, de LT.

#### **GVE Registro**

Barra do Turvo (61), Cajati (37), Cananéia (2), Eldorado (114), Iguape (10), Iporanga (109), Itariri (118), Jacupiranga (17), Juquiá (25), Miracatu (71), Pariquera-Açu (4), Pedro de Toledo (68), Registro (8), Sete Barras (32)

#### **GVE Sorocaba**

Alambari (1), Alumínio (6), Angatuba (4), Araçariguama (4), Araçoiaba da Serra (7), Boituva (4), Campina do Monte Alegre (3), Capela do Alto (4), Cesário Lange (4), Ibiúna (10), Iperó (12), Itapetininga (6), Itu (6), Mairinque (10), Piedade (12), Pilar do Sul (9), Porto Feliz (13), Ribeirão Grande (1), Salto (3), Salto de Pirapora (4), São Miguel Arcanjo (8), São Roque (21), Sarapuí (5), Sorocaba (68), Tapiraí (1), Tatuí (9), Tietê (5), Votorantim (15)

---

### **GVE Campinas**

Águas de Lindóia (1), Amparo (10), Artur Nogueira (8), Atibaia (21), Bom Jesus dos Perdões (4), Bragança Paulista (3), Cabreúva (4), Campinas (17), Campo Limpo Paulista (5), Cosmópolis (9), Holambra (16), Hortolândia (4), Indaiatuba (15), Itatiba (4), Itupeva (3), Jaguariúna (13), Jarinu (1), Joanópolis (2), Jundiá (8), Louveira (2), Monte Alegre do Sul (2), Monte Mor (5), Nazaré Paulista (3), Pedreira (2), Piracaia (1), Santa Bárbara d'Oeste (5), Santo Antônio de Posse (3), Serra Negra (2), Socorro (12), Sumaré (4), Valinhos (2), Vargem (1), Várzea Paulista (8), Vinhedo (4)

### **GVE Itapeva**

Apiá (11), Barra do Chapéu (2), Bom Sucesso de Itararé (1), Buri (3), Guapiara (1), Itaberá (1), Itaóca (50), Itapeva (8), Itapirapuã Paulista (12), Itararé (15), Nova Campina (1), Ribeira (74), Riversul (3)

### **GVE Presidente Venceslau**

Caiuá (1), Dracena (21), Euclides da Cunha Paulista (2), Irapuru (4), Junqueirópolis (30), Marabá Paulista (3), Mirante do Paranapanema (2), Monte Castelo (13), Nova Guataporanga (1), Ouro Verde (5), Panorama (2), Paulicéia (12), Presidente Epitácio (3), Presidente Venceslau (7), Rosana (9), São João do Pau d'Alho (9), Teodoro Sampaio (30), Tupi Paulista (16)

### **GVE Ribeirão Preto**

Altinópolis (1), Barrinha (5), Batatais (2), Cajuru (3), Cravinhos (4), Dumont (1), Guariba (2), Guatapará (12), Jaboticabal (2), Jardinópolis (12), Luís Antônio (2), Monte Alto (8), Pitangueiras (10), Pontal (3), Pradópolis (3), Ribeirão Preto (30), Santa Cruz da Esperança (3), Santa Rita do Passa Quatro (5), Santa Rosa de Viterbo (5), Santo Antônio da Alegria (4), Serra Azul (9), Serrana (24), Sertãozinho (14)

### **GVE Caraguatatuba**

Caraguatatuba (17), Ilhabela (21), São Sebastião (62), Ubatuba (42)

---

### **GVE Marília**

Adamantina (10), Alvinlândia (11), Arco-Íris (1), Bastos (2), Echaporã (1), Flórida Paulista (6), Gália (6), Garça (2), Guaimbê (1), Herculândia (2), Iacri (1), Lucélia (15), Lupércio (4), Mariápolis (1), Marília (7), Oscar Bressane (1), Osvaldo Cruz (9), Pacaembu (6), Parapuã (1), Pompéia (1), Rinópolis (10), Salmourão (22), Tupã (5), Ubirajara (1), Vera Cruz (1)

### **GVE Piracicaba**

Águas de São Pedro (1), Araras (5), Capivari (7), Conchal (15), Elias Fausto (2), Leme (1), Limeira (4), Piracicaba (8), Pirassununga (9), Rio Claro (49), Rio das Pedras (2), Saltinho (1), Santa Gertrudes (1), Santa Maria da Serra (1), São Pedro (6)

### **GVE Araçatuba**

Andradina (9), Araçatuba (14), Auriflama (1), Barbosa (1), Birigui (23), Buritama (2), Castilho (3), Guaraçaí (6), Guararapes (8), Ilha Solteira (2), Lavínia (1), Luiziânia (2), Mirandópolis (8), Murunga do Sul (2), Nova Castilho (1), Nova Independência (9), Penápolis (1), Pereira Barreto (1), Piacatu (9), Rubiácea (2), Santópolis do Aguapeí (1), Turiúba (1)

---

Fonte: Elaborada pelos autores com base em CVE (2020a).

## **3. CONCLUSÃO**

Diante do exposto, pode-se concluir que, apesar da origem relativamente recente da LV no estado de São Paulo, a doença está em rápida expansão, pois após cerca de 20 anos do primeiro caso diagnosticado de LV humana, 97 municípios apresentam transmissão da LV canina e humana confirmada – o que acarretou em 266 mortes –. Existem, ainda, 51 municípios que não apresentam casos autóctones de LV, mas possuem notificação do vetor, podendo, em breve, apresentar a doença. Além disso, embora a LT apresente menor letalidade, o número de casos registrados no estado de São Paulo é três vezes maior que a LV. Frente a esse panorama, ressaltamos a importância de ações voltadas ao controle das leishmanioses e de seus vetores no estado de São Paulo.

## 4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida (processo nº 140750/2019-3).

## 5. REFERÊNCIAS

ANDRADE-FILHO, J.D.; GALATI, E.A.B.; FALCÃO, A.L. *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 481-487, 2007.

ANDRADE-FILHO, J.D.; SCHOLTE, R.G.C.; AMARAL, A.L.G.; SHIMABUKURO, P.H.F.; CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L. Occurrence and Probability Maps of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1430-1434, 2017.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; RAMIREZ, L.E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.

ARAKI, A.S.; VIGODER, F.M.; BAUZER, L.G.S.R.; FERREIRA, G.E.M.; SOUZA, N.A.; ARAUJO, I.B.; HAMILTON, J.G.C.; BRAZIL, R.P.; PEIXOTO, A.A. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. e365, 2009.

BARRETO, M.P. Nova contribuição para o estudo da distribuição geográfica dos flebotomos americanos (Diptera, Psychodidae). **Arquivos de Higiene do Estado de São Paulo**, v. 15, p. 211-226, 1950.

BARRETO, M.P. Catálogo dos flebotomos americanos. **Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo**, v. 5, p. 177-242, 1947.

BRASIL. **Decreto nº 51.838/1963**. Brasília: Presidência da República do Brasil, 1963. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D51838.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D51838.htm)> acesso em 20/03/2020.

BRAZIL, R.P. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban áreas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 263-264, 2013.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; GOMES, A.C.; ANTUNES, L.F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 299-306, 2002.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

CARVALHO, M.R.; VALENÇA, H.F.; SILVA, F.J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T.A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R.P.; BRANDÃO FILHO, S.P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, p. 108-110, 2010.

CASANOVA, C.; COLLA-JACQUES, F.E.; HAMILTON, J.G.C.; BRAZIL, R.P.; SHAW, J.J. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* Chemotype Populations in São Paulo State, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 3, p. e0003620, 2015.

CASANOVA, C.; HAMILTON, J.G.C.; TRIGO, J.R.; COSTA, A.I.P. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 113-115, 2006.

COSTA, A. I. P.; CASANOVA, C.; RODAS, L. A. C.; GALATI, E. A. B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 6, p. 632-633, 1997.

CVE. **Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac"** – Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. 2020a. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/leishmaniose-tegumentar-americana/dados-estatisticos>> acesso em 20/03/2020.

CVE. **Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac"** – Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. 2020b. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/leishmaniose-visceral/dados-estatisticos>> acesso em 20/03/2020.

FORATTINI, O.P.; RABELLO, E.X.; PATTOLI, D.G.B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 4, n. 1, p. 99-100, 1970.

GALVIS-OVALLOS, F.; SILVA, M.D; BISPO, G.B.S.; OLIVEIRA, A.G.; GONÇALVES-NETO, J.R.; MALAFRONTA, R.S.; GALATI, E.A.B. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, n. 2, p. 10, 2017.

GUIMARÃES, V.C.F.V.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA, J.; VOLFOVA, V.; MYSKOVA, J.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; VOLF, P. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 159, 2016.

ICZN. **International code of zoological nomenclature**. International Commission on Zoological Nomenclature. 1999. Disponível em: <<https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/the-code-online/>> acesso em 22/04/2020.

LANZARO, G.C.; LOPES, A.H.; RIBEIRO, J.M.; SHOEMAKER, C.B.; WARBURG, A.; SOARES, M.; TITUS, R.G. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the *Lutzomyia longipalpis* complex. **Insect Molecular Biology**, v. 8, n. 2, p. 267-275, 1999.

LANZARO, G.C.; OSTROVSKA, K.; HERRERO, M.V.; LAWYER, P.G.; WARBURG, A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 6, p. 839-847, 1993.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 84-95, 1912.

MANGABEIRA-FILHO, O. Sobre a sistemática e biologia dos *Phlebotomus* do Ceará. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais**, v. 21, p. 3-26, 1969.

MAPA. **NOTA TÉCNICA nº 11/2016**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>> acesso em 20/03/2020.

MARCONDES, C.B. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 457-462, 1996.

MEDEIROS, A.R.; SILVA Jr, W.A.; ROSELINO, A.M. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. **Clinics**, v. 63, n. 4, p. 451-456, 2008.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

OLIVEIRA, A.M.; VIEIRA, C.P.; DIBO, M.R.; GUIRADO, M.M.; RODAS, L.A.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233-242, 2016.

OLIVEIRA, S.S.; HIRAMOTO, R.M.; RANGEL, O.; HENRIQUES, L.F.; VIVIANI-JUNIOR, A.; TANIGUCHI, H.H.; BARBOSA, J.E.R.; CASANOVA, C.; SAMPAIO, S.M.P.; SPINOLA, R.; REHDER, S.; LINDOSO, J.A.L.; TOLEZANO, J.E. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2018. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 16, n. 192, p. 29-46, 2019.

OPAS. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C, 2019.

PALFRAMAN, M.J.; BANDI, K.K.; HAMILTON, J.G.C.; PATTENDEN, G. Sobralene, a new sex-aggregation pheromone and likely shunt metabolite of the taxadiene synthase cascade, produced by a member of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* species complex. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 20, p. 1921-1923, 2018

RANGEL, O.; SAMPAIO, S.M.P.; HENRIQUES, L.F.; MORAIS, G.S.C.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C. Vigilância Entomológica no Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral do Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 16, n. 192, p. 47-57, 2019.

RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.M.; SILVA, M.E.; SANTOS, C.C.P.; FRÉZARD, F.J.G.; SILVA, S.M. Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 12, 2018.

SANCHES, L.C.; MARTINI, C.C.; NAKAMURA, A.A.; SANTIAGO, M.E.B.; LIMA, B.D.; LIMA, V.M.F. Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania*

*amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 465-469, 2016.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SAÚDE. **Portaria Interministerial nº 1.426/2008**. Ministério da Saúde. 2008. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)> acesso em 20/03/2020.

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrópica**, v. 11 (supl. 1), p. 685-704, 2011.

SHIMABUKURO, P.H.F.; SILVA, T.R.R.; FONSECA, F.O.R.; BATON, L.A.; GALATI, E.A.B. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 121, 2010.

SILVEIRA, R.C. Distribuição e frequência da Leishmaniose em S Paulo. **Teses da Faculdade de Medicina e Cirurgia de São Paulo**, 72p, 1919.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Ministério da Saúde. 2020. Disponível em: <<https://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>>. Acesso em 20/03/2020.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOUZA, N.A.; ANDRADE-COELHO, C.A.; VIGODER, F.M.; WARD, R.D.; PEIXOTO, A.A. Reproductive isolation between sympatric and allopatric Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 216-219, 2008.

SOUZA, N.A.; BRAZIL, R.P.; ARAKI, A.S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p.161-174, 2017.

SPIEGEL, C.N.; DIAS, D.B.S.; ARAKI, A.S.; HAMILTON, J.G.C.; BRAZIL, R.P.; JONES, T.M. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 580.

TOLEZANO, J.E.; ARAÚJO, M.F.L.; BALANCO, J.M.F.; VALENTIN, A.M.; BARCA, M.L. *Leishmania* sp. isolated from blood heart of *Akodon* sp. (Rodentia, Cricetidae) caught in Iguape City, São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 38, 1988.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.I.; BARBOSA, J.A.; BARBOSA, J.E.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba Country, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 280-284, 2007.

VIRBAC. **Bula do Milteforan™**. Virbac Brasil. 2020. Disponível em: <<https://br.virbac.com/products/antiparasitarios-internos/milteforan>> acesso em 23/03/2020.

WARBURG, A.; SARAIVA, E.; LANZARO, G.C.; TITUS, R.G.; NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **The Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 345, p. 223-230, 1994.

WARD, R.D.; RIBEIRO, A.L.; READY, P.D.; MURTAGH, A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), (Diptera: Psychodidae), the vector of *Leishmania donovani chagasi* Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n.3, p. 269-280, 1983.

WERNECK, G.L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n.12, p. 2937-2940, 2008.

## LEISHMANIOSE VISCERAL: CONTRIBUIÇÕES HISTÓRICAS E AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO PARA O CONTROLE DA DOENÇA

**Williane Fernanda Siqueira<sup>1</sup>, Mariana Santos Cardoso<sup>2</sup>, Ana Laura Grossi de Oliveira<sup>1</sup>, Daniella Castanheira Bartholomeu<sup>2</sup>, Lilian Lacerda Bueno<sup>1,2</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1,2</sup>**

1. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil;

2. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante doença infecciosa, que integra um complexo grupo de doenças parasitárias, causadora de grande impacto socioeconômico e de morbimortalidade no Brasil e no mundo. A LV é considerada a forma mais grave dentre os diferentes tipos de leishmaniose, podendo levar a morte dos indivíduos acometidos em 90% dos casos, se não diagnosticada e tratada. No Brasil, a LV é uma zoonose vetorial, tendo os cães domésticos como reservatórios primários no ambiente urbano. Dentre as medidas de controle da doença, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda a eliminação de cães infectados, uma vez que, a infecção humana é precedida pela infecção canina, além do diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos. Assim, um diagnóstico sorológico seguro e acurado é necessário, visto que um resultado erroneamente positivo pode levar ao tratamento equivocado de pacientes não infectados e um resultado falso negativo possibilita a progressão da doença e, conseqüentemente, a evolução do paciente para o óbito. A descoberta e o uso de alvos recombinantes vêm melhorando o desempenho das principais técnicas empregadas no diagnóstico da doença. No entanto, há a necessidade de associar a busca por novos alvos moleculares ao desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico, como os biossensores, que também permitam utilizar diferentes amostras biológicas, como sangue, soro, plasma e urina. Tomadas em conjunto, essas estratégias poderão transpor as barreiras existentes dos métodos diagnósticos atualmente disponíveis, podendo, deste modo, contribuir para o controle da LV através de um teste mais eficiente e confiável.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral, diagnóstico e proteínas recombinantes.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an important infectious disease that integrates a complex group of parasitic diseases, causing great socioeconomic impact and morbidity and mortality

in Brazil and worldwide. VL is considered the most severe form among the different types of leishmaniasis, and it can lead to the death of individuals affected in 90% of cases, if not diagnosed and treated. In Brazil, VL is a vectorial zoonosis, with domestic dogs as primary reservoirs in the urban environment. Among the disease control measures, the Ministry of Health of Brazil recommends the elimination of infected dogs, since the human infection is preceded by the canine infection, in addition to the early diagnosis and the treatment of human cases. Therefore, a safe and accurate serological diagnosis is necessary, since an erroneously positive result can lead to the wrong treatment of uninfected patients and a false negative result allows the progression of the disease and, consequently, the patient's evolution to death. The discovery and use of recombinant targets have improved the performance of the main techniques used in the diagnosis of the disease. However, there is a need to associate the search for new molecular targets with the development of new diagnostic platforms, such as biosensors, which also allow the use of different biological samples, as blood, serum, plasma and urine. Taken together, these strategies will be able to overcome the existing barriers of currently available diagnostic methods, being able to contribute to the control of VL through a more efficient and reliable test.

**Keyword:** Visceral leishmaniasis, diagnosis and recombinant proteins.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica e de curso crônico, causada por parasitos intracelulares pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, no qual se encontram as espécies responsáveis pela visceralização da doença, como a *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (SRIVASTAVA et al., 2011). A transmissão da LV ocorre por meio da picada de insetos hematófagos, fêmeas, pertencentes sobretudo aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (FARIA et al. 2015). No Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a doença apresenta caráter zoonótico, sendo os cães domésticos (*Canis familiaris*) considerados a principal fonte de infecção por *Leishmania*, desempenhando um importante papel na manutenção do ciclo no ambiente urbano e na transmissão da LV (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

A forma visceral da doença, também conhecida como calazar (kala-azar), é considerada a forma mais grave da leishmaniose, sendo caracterizada por longos períodos febris, perda de peso, anemia e alterações em órgãos internos como baço e fígado, podendo levar a morte dos indivíduos acometidos em 90% dos casos, se não diagnosticada e tratada (BRASIL, 2016). Além disso, a LV está na lista das doenças tropicais negligenciadas e persiste como sério problema de saúde pública, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo (COSTA et al., 2013).

No Brasil, a doença é endêmica e encontra-se em franca expansão territorial para municípios que ainda não diagnosticavam casos (BRASIL, 2016). De acordo com dados do Ministério da Saúde (2019), de 2010 a 2018, foram confirmados um total de 30.666 casos de LV humana (LVH), dos quais 2.292 evoluíram para óbitos. Ainda que os dados da doença sejam alarmantes no Brasil, medidas de vigilância e controle desta zoonose vêm sendo constantemente empregadas com destaque para o diagnóstico precoce, seguido pelo tratamento adequando dos casos humanos.

Nesta perspectiva, o desenvolvimento de testes diagnósticos acurados e precisos, que apresentem sensibilidade suficiente para identificar corretamente os casos humanos e cães infectados, minimizando o número de casos falsos negativos, e que possuam especificidade satisfatória, permitindo a correta discriminação dos indivíduos e evitando resultados falsos positivos, é extremamente desejável. Isto facilitaria o diagnóstico da LVH e, por consequência, o acesso ao tratamento seria mais rápido e preciso. É conveniente recordar que o diagnóstico para a LV canina (LVC) pode auxiliar no controle da infecção em cães e, por conseguinte, na redução da infecção humana, uma vez que, a enzootia canina precede o aparecimento de casos humanos e a infecção de cães tem sido mais predominante do que a humana (BRASIL, 2014).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTRIBUIÇÕES HISTÓRICAS DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Em 1934, quando inesperadamente, Henrique Penna relatou a descoberta do parasito *Leishmania* sp. em cortes histológicos humanos *post-mortem*, seguido pelo primeiro diagnóstico humano, *in vivo*, por Evandro Chagas, em 1936, deu-se início a estudos epidemiológicos da LV em diferentes regiões do país (CHAGAS et al., 1937). Como consequência, alguns anos depois, as primeiras ações de vigilância e controle da doença iniciaram-se direcionadas aos principais agentes envolvidos no ciclo de transmissão da doença, como insetos vetores, reservatório canino e casos humanos, com destaque para a identificação precoce dos indivíduos infectados por *Leishmania*.

Desde a década de 1930, o diagnóstico da LV é realizado tendo como base a tríade composta pelos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico por

exames laboratoriais é geralmente associado aos parâmetros clínicos e epidemiológicos, uma vez que os sintomas clássicos da LV são semelhantes ao quadro clínico de outras patologias (BRASIL, 2014).

### **2.1.1 Diagnóstico clínico**

Nos humanos, a LV apresenta vários sinais e sintomas observados em outras patologias o que torna o diagnóstico clínico complexo e sujeito a incertezas. Estes sintomas podem variar de paciente para paciente, dependendo de fatores como o tipo de cepa presente e aspectos imunológicos dos pacientes. Sendo assim, há indivíduos assintomáticos e aqueles que apresentam febre e esplenomegalia associada ou não à hepatomegalia e pancitopenia (BRASIL, 2014). Por sua vez, a doença na população canina apresenta-se assintomática na grande maioria dos casos, mas quando os sinais estão presentes variam de alterações cutâneas leves, alopecia e apatia a sinais severos caracterizados por adenopatia linfóide, anorexia, aumento do tamanho do baço e do fígado, onicogribose e ceratoconjuntivite (BRASIL, 2014).

### **2.1.2 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose é realizado através da interpretação dos resultados de exames de sangue, como hemogramas ou dosagem de proteínas, exames parasitológicos, sorológicos ou moleculares, cada um com vantagens e limitações inerente ao método (BRASIL, 2014). No entanto, nenhum destes testes tem-se mostrado suficientemente seguro, preciso, prático e rápido, simultaneamente, comprometendo a eficiência do controle da doença (FARIA et al., 2015).

#### **2.1.2.1 Diagnóstico laboratorial complementar**

Um hemograma em pacientes com a LV é caracterizado por pancitopenia, ou seja, decréscimo na contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, como em outras doenças infecciosas e parasitárias. Em relação à dosagem de proteínas, há forte inversão da relação de albumina e globulina marcada por uma hiperglobulinemia (BRASIL, 2014). No entanto, apenas esses dados não são suficientes para elucidar ou não a presença da doença em um indivíduo.

### 2.1.2.2 Exames parasitológicos

Os métodos parasitológicos diretos, baseados na visualização microscópica direta ou no cultivo do parasito realizados através de material de biópsia de punção aspirativa do baço, medula óssea ou linfonodos, são considerados o padrão ouro para o diagnóstico da LV desde a década de 1930, permanecendo assim nos dias atuais (SRIVASTAVA et al., 2011). Esses métodos apresentam níveis de especificidade que podem chegar a 100% (BRASIL, 2014). Todavia, sua sensibilidade é muito variável (60 a 95%), pois a distribuição dos parasitos não é homogênea nos tecidos e a capacidade de detecção é dependente da carga parasitária do indivíduo e do material analisado (GONTIJO; MELO, 2004). Apesar da alta especificidade, a coleta de material biológico para a realização do diagnóstico parasitológico é feita por meio de técnicas invasivas, dolorosas e arriscadas para os pacientes. Com isso não possuem aplicabilidade em campo devido aos riscos gerados aos indivíduos, necessitando de mão de obra técnica qualificada tanto para a coleta de material quanto para interpretação da microscopia (SRIVASTAVA et al., 2011).

### 2.1.2.3 Métodos moleculares

Métodos de diagnósticos por meio de técnicas moleculares com o objetivo de identificar parasitos do gênero *Leishmania* surgiram a partir da década de 1980 (SRIVASTAVA et al., 2011). O uso dessas técnicas moleculares tem se tornado cada vez mais imprescindível por sua boa precisão e a possibilidade de uso de amostras de sangue periférico, soro e urina, evitando assim métodos invasivos como a aspiração da medula óssea, linfonodos, baço e fígado (SRIVASTAVA et al., 2011). Técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) vêm sendo utilizadas no diagnóstico da leishmaniose, sendo a PCR convencional a mais empregada atualmente (TRAVI et al., 2018). A sensibilidade, especificidade, precisão e reprodutibilidade das técnicas moleculares são muito variadas, dependendo da escolha do tecido biológico ou alvo utilizado (SRIVASTAVA et al., 2011). No entanto, uma sensibilidade de até 94% pode ser facilmente obtida (BRASIL, 2014). A PCR pode também ser utilizada para acompanhamento de cura do paciente durante o tratamento ou pós-tratamento. Apesar da evolução tecnológica da PCR, para o serviço público de saúde, essa técnica é onerosa, necessitando de equipamentos sofisticados, além de profissionais qualificados. Sendo assim, este tipo de diagnóstico possuiu menor

aplicabilidade em campo e uso restrito no rastreio em massa da população (ABEIJON et al., 2019)

#### 2.1.2.4 Métodos sorológicos

Uma alternativa aos métodos parasitológicos invasivos são os ensaios sorológicos, uma vez que a LV é caracterizada por uma grande produção de anticorpos específicos juntamente com a estimulação de célula B policlonais (BRASIL, 2014). Um vasto número de técnicas sorológicas está disponível para o diagnóstico da doença, possibilitando um amplo espectro de variações de sensibilidade e especificidade, custo-benefício e aplicabilidade em campo e em massa (SRIVASTAVA et al., 2011; FARIA et al., 2015). As técnicas sorológicas mais comumente empregadas no diagnóstico da LV são: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de aglutinação direta (DAT), o ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA), e, mais recentemente, os dispositivos imunocromatográficos, conhecidos como teste rápido imunocromatográfico (TRI) (SRIVASTAVA et al., 2011).

A RIFI teve seu início na década de 1980 (BADARÓ; REED; CARVALHO, 1983). Esta técnica já foi considerada o padrão ouro para a confirmação da infecção por *Leishmania*, além de já ter sido o exame sorológico mais utilizado no Brasil (BRASIL, 2014). Esta técnica baseia-se na busca por anticorpos através do reconhecimento de antígenos íntegros de promastigotas de *Leishmania*. A RIFI foi bastante utilizada em inquéritos populacionais e apresenta uma sensibilidade que pode variar de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% (SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Porém, trata-se de um ensaio de interpretação subjetiva, dependente da experiência do microscopista e de equipamentos relativamente sofisticados, o que o torna laborioso, caro e de difícil reprodução em campo (SOLANO-GALLEGO et al., 2014). Apesar dessa técnica, atualmente, ainda ser utilizada para o diagnóstico da LVH, em 2012, o Ministério da Saúde alterou o protocolo utilizado nos inquéritos epidemiológicos caninos, substituindo a RIFI pela introdução do teste rápido (COURA-VITAL et al., 2014).

Desenvolvido por El Harith et al. (1988), o DAT detecta anticorpos em fluidos biológicos na presença de promastigotas fixadas, que após um determinado período de incubação, observa-se uma reação de aglutinação visível a olho nu. O DAT trata-se de um método simples, de fácil execução e relativamente barato. Uma revisão sistemática, realizada por Chappuis et al. (2006), mostrou que este método apresenta uma sensibilidade

de 94,8% e especificidade de 85,9%. Apesar de se tratar de um teste simples, as desvantagens deste método são o tempo dispendioso durante o período de incubação, a necessidade de uma pipetagem múltipla e a incapacidade de diferenciar entre infecções clinicamente ativa e assintomática, mostrando-se positivo por muito tempo após a cura (SRIVASTAVA et al., 2011).

Introduzido na década de 1970, por Hommel et al. (1978), o ELISA é um dos exames sorológicos mais utilizados atualmente, tanto para o diagnóstico humano como o canino. Essa técnica é vantajosa, pois é uma ferramenta relativamente simples e rápida, que pode ser realizada manualmente ou ser automatizada, além de permitir a análise de um grande número de amostras, simultaneamente, em um curto espaço de tempo (SRIVASTAVA et al., 2011). O ELISA possibilita o uso de diferentes tipos de antígenos, como o extrato bruto ou solúvel de *Leishmania* ou ainda proteínas recombinantes, e sua sensibilidade e especificidade variam de acordo com o antígeno empregado (SOLANO-GALLEGO et al., 2014). O uso de antígeno bruto nesta técnica tem se mostrado um fator limitante de sua especificidade, neste contexto, as proteínas recombinantes surgiram como uma alternativa nos diagnósticos sorológicos baseados em ELISA. Diversos antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido caracterizados e testados a fim de melhorar o sorodiagnóstico da leishmaniose por ELISA, entre eles destaca-se o antígeno recombinante K39 (rK39), que apresentou os resultados mais promissores para o diagnóstico da doença (BURNS et al., 1993). Assim como a RIFI, o ELISA também é dependente de mão de obra qualificada para interpretação dos resultados e equipamentos que até o momento não foram otimizados para uso em campo. Outra desvantagem da técnica é a possibilidade de reações cruzadas com outras doenças, como doença de Chagas, esquistossomose, entre outras (BRASIL, 2014).

Por sua vez, o TRI é um teste qualitativo que em sua maioria tem como base a detecção de anticorpos em soro, plasma ou sangue, através de antígenos recombinantes fixado em uma fita de celulose (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016). Apresentando uma sensibilidade de 67 a 100% e especificidade de 70 a 100%, esse teste foi desenvolvido para facilitar o diagnóstico da doença *in situ* (ABASS et al., 2013). Atualmente, estão disponíveis alguns kits comerciais de TRI, que foram devidamente padronizados e validados tanto para uso em campo como em laboratório (BOELAERT et al., 2014). O baixo-custo, fácil execução, resultado rápido e a independência de tecnologia e de mão de obra qualificada tornaram este teste uma excelente ferramenta para a triagem em massa. No entanto, é relatada reatividade cruzada com outras parasitoses e outras doenças, bem

como dificuldade de detecção de indivíduos assintomáticos (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

## 2.2 AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

### 2.2.1 Proteínas recombinantes

Recentemente, os avanços tecnológicos em torno do diagnóstico da LV têm se direcionado para as pesquisas de imunoenaios, a base de moléculas recombinantes mais sensíveis e específicas, visando evitar reações falso-negativas e falso-positivas, tanto para o diagnóstico de triagem, quanto para o diagnóstico confirmatório da doença. Dentre as vantagens da utilização das moléculas recombinantes, pode-se citar a produção em larga escala de uma forma padronizada de antígeno e independente do crescimento da *Leishmania* em culturas laboratoriais (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Os antígenos recombinantes surgem como uma alternativa de melhoramento dos métodos sorológicos atualmente utilizados, como DAT, RIFI e ELISA, pois trata-se de moléculas próprias do parasito que possuem grande afinidade com anticorpos presentes na maioria das amostras biológicas (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016). Ao longo dos anos, várias proteínas recombinantes de *L. infantum* e *L. donovani*, com sensibilidade e especificidade variáveis, foram caracterizadas e avaliadas, demonstrando serem úteis na discriminação da LV (Tabela 1).

**Tabela 2.** Principais antígenos descritos na literatura para uso em testes sorológicos para LV.

| Antígeno | Espécie   | Origem proteica                   | Origem | Sen. (%)   | Esp. (%)   | Autor (ano)            |
|----------|---|-----------------------------------|--------|--|--|------------------------|
| rK39     | <i>L. infantum</i><br>(sin. <i>L. chagasi</i> ) | Proteína relacionada à kinesina   | Brasil | 26,5 – 100,0<br>(ELISA)<br>67,0 – 100,0<br>(TRI) | 73,7 – 100,0<br>(ELISA)<br>70,0 – 100,0<br>(TRI) | BURNS et al., 1993     |
| rA2      | <i>L. donovani</i>                              | Proteína específica de amastigota | Canadá | 62,7 – 100,0                                     | 77,59 – 100                                      | GHEDIN et al., 1997    |
| rK9      | <i>L. infantum</i><br>(sin. <i>L. chagasi</i> ) | Proteína hidrofílica              | Brasil | 78,0   | 84,0   | BHATIA et al., 1999    |
| rK26     | <i>L. infantum</i><br>(sin. <i>L. chagasi</i> ) | Proteína hidrofílica              | Brasil | 38,0 – 100,0                                     | 90,0 – 100,0                                     |                        |
| rKE16    | <i>L. donovani</i>                              | Kinesina                          | Índia  | 32,4 – 100,0                                     | 92,9 – 100,0                                     | SIVAKUMAR et al., 2006 |
| KRP42    | <i>L. donovani</i>                              | Kinesina                          | Japão  | 94,4 – 94,6                                      | 99,3 – 96,0                                      | TAKAGI et al., 2007    |

|       |   |                                       |          |              |              |                                 |
|-------|---|---------------------------------------|----------|--------------|--------------|---------------------------------|
| rK28  | <i>L. donovani</i>                              | HASPB1/LdK39/<br>HASPB2               | Sudão    | 90,6 – 100,0 | 56,4 – 100,0 | PATTABHI<br>et al., 2010        |
| KLO8  | <i>L. donovani</i>                              | Proteína<br>relacionada à<br>kinesina | Alemanha | 96,2 – 100,0 | 96,1 – 100,0 | ABASS et<br>al., 2013           |
| rKR95 | <i>L. donovani</i>                              | Proteína<br>relacionada à<br>kinesina | USA      | 66,0         | 89,5         | VALLUR et<br>al., 2016          |
| rKDDR | <i>L. infantum</i><br>(sin. <i>L. chagasi</i> ) | Proteína<br>relacionada à<br>kinesina | Brasil   | 88,5 – 92,9  | 97,3 – 100,0 | DHOM-<br>LEMONS et<br>al., 2019 |

Sen: sensibilidade; Esp: especificidade; TRI: teste rápido imunocromatográfico.

O início da corrida por novas moléculas antigênicas, direcionadas ao diagnóstico da LV, deu-se no início dos anos 90, quando Burns et al. (1993) caracterizaram um antígeno relacionado à superfamília de proteínas kinesinas de *L. infantum* para o aperfeiçoamento do diagnóstico humano e canino. As kinesinas fazem parte de uma superfamília de proteínas motoras, que estão envolvidas no processo de mitose e movimentação do flagelo das espécies de *Leishmania* e são também responsáveis pela locomoção das vesículas (BLAINEAU et al., 2007). Burns et al. (1993) avaliaram um antígeno de 230 kDa, denominado LiKin, relacionado à molécula de kinesina, que é codificado por um gene de *L. infantum* (locus tag: Linj.14.1180) e mantém-se conservado entre as espécies de *Leishmania* viscerotrópicas. A partir de um fragmento desse antígeno, uma proteína recombinante, a rK39, foi gerada e caracterizada, contendo um epítipo altamente imunogênico, que apresenta uma série de porções repetitivas de 39 aminoácidos. Badaró et al. (1996) caracterizaram e avaliaram a rK39 em relação ao antígeno bruto lisado de *Leishmania* para detecção de anticorpos e obtiveram resultados que confirmaram a natureza altamente específica do rK39 com sensibilidade de 99% e especificidade 100%. A relação promissora da rK39 com o diagnóstico da LV está associada à presença de uma região abundantemente repetitiva em sua sequência proteica, que aparentemente a torna altamente antigênica (BURNS et al., 1993, BHATIA et al., 1999, SIVAKUMAR et al., 2006, ABASS et al., 2013). Contudo, estudos de validação desse antígeno têm mostrado resultados de desempenho variáveis, de acordo com a região geográfica da pesquisa e metodologia empregada (SRIVASTAVA et al., 2011). Apesar do bom desempenho da rK39 obtido em países como Nepal e Índia (BERN et al., 2000, MOHAPATRA et al., 2010), em países como o Brasil e outros do leste africano, seu desempenho ainda é baixo (CUNNINGHAM et al., 2012).

O antígeno hidrofílico K26, que foi descrito Bhatia et al. (1999), possui 11 repetições de uma sequência de 14 aminoácidos. O rK26 tem uma sensibilidade variando de 38 a 100% e uma especificidade de 90 a 100% (MOHAPATRA et al., 2010; PATTABHI et al., 2010; TERÁN-ÁNGEL et al., 2010; TRAVI et al., 2018).

Recentemente, foi descrito por Dhom-Lemos et al. (2019), o antígeno recombinante KDDR, que tem como base predominantemente a porção repetitiva encontrada na proteína kinesina de *L. infantum*. Enquanto, a proteína rK39 é composta por duas partes, sendo uma não repetitiva e outra repetitiva, com aproximadamente 6,5 motivos de 39 aminoácidos, a rKDDR é composta por uma sequência recorrente de 8,5 blocos repetitivos de 39 aminoácidos da kinesina, que corresponde a 92% da sequência total da proteína (DHOM-LEMOs et al., 2019). Essa nova proteína mostrou-se promissora ao ser comparada em testes de ELISA com o antígeno rK39. O reconhecimento sorológico humano frente à rKDDR utilizando ELISA apresentou maior sensibilidade e especificidade (92,4% e 100,0%, respectivamente) quando comparada com ao teste de ELISA da rK39, que apresentou sensibilidade e especificidade de 90,48% e 97,92%, respectivamente. Por sua vez, para o diagnóstico canino através do ELISA, o ensaio com rKDDR apresentou uma maior sensibilidade (88,54%) e especificidade (97,30%) quando comparado com rK39, que apresentou sensibilidade de 78,13% e especificidade de 90,09%.

Sendo assim, embora haja inúmeros antígenos recombinantes disponíveis para o diagnóstico da LV com boa eficácia e apesar do uso contínuo do promissor antígeno rK39, nenhum desses se mostrou 100% efetivo no sorodiagnóstico dessa doença, indicando a necessidade de um aprimoramento dos antígenos capazes de proporcionar um resultado de maior confiabilidade (FARIA et al., 2015). Além disso, é necessário o desenvolvimento de novas plataformas que melhorem e amplifiquem o desempenho das proteínas recombinantes.

### **2.2.2 Testes diagnósticos utilizando urina como amostra biológica**

Há aproximadamente duas décadas surgia o primeiro relato do desenvolvimento de um teste para detectar antígenos leishmaniais na urina de pacientes com LV, um novo teste de aglutinação em látex (KAtex) (ATTAR et al., 2001). Este estudo abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de testes sorológicos para a LV, pois durante a doença diversas proteínas produzidas pela *Leishmania* são metabolizadas e eliminadas através da urina do hospedeiro. Desde então, vários métodos sorológicos foram descritos para diagnóstico da

LV utilizando urina de pacientes, incluindo ELISA, DAT, KAtex e teste rápido (Tabela 2) (ASFARAM et al., 2018). A principal vantagem dos testes que utilizam urinas como amostra biológica é a facilidade de obtenção do material, o fato de poder ser coletada várias vezes sem causar desconforto ao paciente, a amostra não necessita de processamento e o baixo custo envolvido na coleta do material somado, principalmente, ao fato de ser menos invasivo e arriscado ao paciente (ABEIJON et al., 2019).

**Tabela 2.** Sensibilidade e especificidade de testes diagnósticos para a LV utilizando urina como amostra biológica.

| Teste diagnóstico | Sen. (%)     | Esp. (%)    | Referências             |
|-------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| KAtex             | 68,0 – 100,0 | 100,0       | ATTAR et al., 2001      |
| ELISA             | 93,5 – 95,0  | 89,3 – 95,3 | ISLAM et al., 2008      |
| DAT               | 90,7         | 96,4        | ISLAM et al., 2008      |
| PCR               | 97,0         | 100,0       | MOTAZEDIAN et al., 2008 |
| rK39              | 95,0         | 93,3        | KHAN et al., 2010       |

Sen: sensibilidade; Esp: especificidade.

Diferentemente dos testes sorológicos “tradicionais”, nos quais se busca a detecção de anticorpos nas amostras biológicas, nos testes que utilizam urina, em sua maioria, espera-se identificar antígenos secretados pelo parasito. Essa inversão de alvos, a serem identificados na amostra dos pacientes, em princípio fornece melhores meios para o diagnóstico da LV, pois dois grandes problemas na detecção de anticorpos é o fato de indivíduos coinfectados com o vírus HIV ou indivíduos com a infecção na fase inicial ou assintomática apresentarem baixa resposta de anticorpos frente aos antígenos do parasito (ATTAR et al., 2001).

Deve-se considerar ainda que um teste no qual se faça a detecção de antígenos e não a identificação de anticorpos pode auxiliar na diferenciação dos casos ativos de exposições anteriores ao parasito ou mesmo ajudar no acompanhamento da eficácia terapêutica dos pacientes com LV (ABEIJON et al., 2019). Amostras de pacientes que tiveram leishmaniose, que estão em tratamento ou mesmo os que já terminaram o tratamento, podem apresentar “anticorpos de memória” durante determinado período que, por sua vez, podem ser detectados nos testes sorológicos “tradicionais”, resultando em laudos falsos positivos ou mesmo indicando a não cura do paciente pós-tratamento (ABEIJON et al., 2019).

Entretanto, o uso da urina como amostra clínica para o diagnóstico da LV não se limita apenas a testes sorológicos, sendo utilizada também na extração de ácido nucleico do parasito para uso no diagnóstico molecular da doença e para a cultura de *Leishmania* isoladas da urina de pacientes (BEZERRA et al., 2019). Da Costa Lima et al. (2018) mostraram que, de 30 amostras de pacientes com leishmaniose visceral, 6 apresentavam DNA de *Leishmania*. Além disso, neste mesmo estudo, promastigotas foram isolados em cultura da urina de um paciente.

Embora, a urina tenha se tornado uma amostra biológica valiosa para o diagnóstico da LVH, ainda não é amplamente utilizada, pois apresenta limitações como a presença de detritos e inibidores da amplificação por PCR, falta de um método eficiente de extração de DNA urinário e o baixo número de parasitos presentes na urina (BEZERRA et al., 2019). Tais limitações podem explicar, porém não justificar, a falta de um kit comercial simples, rápido e menos invasivo nos dias atuais, que possa ser utilizado tanto em laboratórios e centros de referência de ponta como em locais com limitações de recursos, mão de obra e equipamento sofisticados.

### **2.2.3 Imunobiossensores**

Além da busca incessante por novas moléculas para serem utilizadas nas plataformas existentes (FARIA et al., 2015), é necessário direcionar os recursos e pesquisas para a descoberta de técnicas diferentes que sejam tão práticas quanto um teste rápido e com acurácia superior a um ELISA e que possibilite o uso destas moléculas.

Recentemente, têm sido desenvolvidas várias pesquisas direcionadas ao uso de biossensores ou imunobiossensores, baseados na detecção eletroquímica, impedância elétrica, piezoelectricidade, técnicas cromatográficas de moléculas, entre outros (CABRAL-MIRANDA et al., 2014; SOUTO et al., 2013; CORDEIRO et al., 2019). Tais técnicas permitem a utilização de biomateriais capazes de detectar substâncias ou componentes químicos de uma determinada amostra por diferentes metodologias, possibilitando a inferência de um valor de positividade ou negatividade (CANFAROTTA et al., 2018). Em suma, estes testes, em sua maioria, baseiam no mesmo princípio dos imunoenaios: a interação antígeno/anticorpo, permitindo não somente um resultado qualitativo, mas também quantitativo (CABRAL-MIRANDA et al., 2014).

Um estudo, realizado por Cordeiro et al. (2019), no qual um imunossensor de impedância eletroquímica, usando eletrodos serigrafados (SPEs) para a detecção de

anticorpos anti-*L. infantum*, mostrou-se sensível, específico, rápido e simples, com potencial aplicação para o diagnóstico sorológico da LV. Em outra pesquisa, um imunossensor de ressonância plasmônica de superfície (SPR) foi desenvolvido, usando um chip sensor de ouro modificado com ácido 11-mercaptopundecanóico (11-MUA), também mostrou promissores resultados na identificação de anticorpos de anti-*L. infantum* (SOUTO et al., 2013). Outro imunossensor de microbalança de cristal de quartzo, utilizando um antígeno recombinante de *L. chagasi* (rLci2B-NH6), foi estudado para o uso no diagnóstico da LVC, sendo capaz de distinguir soros caninos positivo e negativo para *L. chagasi*, além de apresentar bons resultados quanto à sensibilidade e reprodutibilidade (RAMOS-JESUS et al., 2011). Um dispositivo bioeletrônico capaz de detectar rapidamente antígenos de *Leishmania* sp. foi proposto por Cabral-Miranda et al. (2014), sendo capaz de detectar  $1,8 \times 10^4$  amastigotas/g de tecido infectado.

Seguindo a tendência das pesquisas dirigidas aos biossensores, nosso grupo de pesquisa vem emergindo neste novo nicho de mercado, procurando desenvolver um imunobiossensor capaz de detectar analitos de uma determinada amostra por meio da medição do bloqueio do transporte de calor em um circuito de termopar, devidamente registrado em um compartimento isolado. Este novo biossensor é baseado na tecnologia denominada MIPs (*molecularly imprinted polymers*), que é composta por receptores sintéticos que possuem sítios de reconhecimento às moléculas complementares de interesse em termos de tamanho, formato e orientação de grupos químicos funcionais, permitindo a identificação de diversas moléculas (CANFAROTTA et al., 2018). Os biossensores utilizando os MIPs superam muitas questões associadas ao uso de receptores biológicos, devido à sua estabilidade química e térmica em longo prazo, além de ter um processo de síntese de baixo custo (DILIEN et al., 2017). Essa nova ferramenta diagnóstica surge como uma alternativa às atuais plataformas diagnósticas disponíveis, sendo economicamente viável para poder alçar a camada da população desprovida de recursos e, conseqüentemente, a mais acometida pelas doenças negligenciadas como a LV.

Diante dos inúmeros exemplos supracitados fica evidente o crescente interesse direcionado às pesquisas com biossensores e seus resultados prósperos indicam uma grande promessa como um sistema de detecção sensível, específico, rápido e simples, com potencial aplicação para campo ou laboratório para o diagnóstico sorológico da LV.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, apesar da disponibilidade de testes rápidos para a LV, estes ainda se baseiam em antígenos selecionados por metodologias convencionais e ainda há limitação de desempenho diagnóstico (sensibilidade e especificidade), que poderiam ser melhorados com a aplicação de novas metodologias. Portanto, políticas de investimentos em pesquisas e desenvolvimento tecnológico de novas plataformas diagnósticas, bem como, a busca e o aprimoramento de novos alvos para o diagnóstico da LV são um dos caminhos para o controle dessa doença de forma mais rápida e eficaz. Uma vez que, o correto diagnóstico pode permitir o início imediato do tratamento e a vigilância epidemiológica em maior escala, auxiliando na tomada de decisões clínicas e epidemiológicas e, assim, promover melhores ações de controle da doença.

Contudo, faz-se necessário o interesse e a contribuição do setor público aliado ao setor privado para o registro e validação de novos testes de diagnóstico. A necessidade de realização de estudos multicêntricos, para avaliar a eficácia de novos testes, também é uma demanda que necessita ser sanada para que de fato novos testes ou novas plataformas de diagnóstico deixem de ser trabalhos publicados em jornais e revistas científicas e sejam realmente introduzidos no mercado.

### 5. REFERÊNCIAS

ABASS, E.; BOLLIG, N.; REINHARD, K.; CAMARA, B.; MANSOUR, D.; VISEKRUNA, A.; LOHOFF, M.; STEINHOFF, U. rKLO8, a novel *Leishmania donovani* - derived recombinant immunodominant protein for sensitive detection of visceral leishmaniasis in Sudan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2322, 2013.

ABEIJON, C.; ALVES, F.; MONNERAT, S.; WASUNNA, M.; MBUI, J.; VIANA, A.G.; et al. Development of a Multiplexed Assay for Detection of *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* Protein Biomarkers in Urine Samples of Patients with Visceral Leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 57, n. 5, p. e02076-18, 2019.

ASFARAM, S.; HOSSEINI TESHNIZI, S.; FAKHAR, M.; BANIMOSTAFAVI, E.S.; SOOSARAEI, M. Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. **Parasitol Int**, v. 67, n. 5, p. 575-583, 2018

ATTAR, Z.J.; CHANCE, M.L.; EL-SAFI, S.; CARNEY, J.; AZAZY, A.; EL-HADI, M.; DOURADO, C.; HOMMEL, M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 78, n. 1, p. 11-16, 2001.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.

BADARÓ, R.; REED, S.G.; CARVALHO, E.M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, n. 3, p. 480-484, 1983.

BERN, C.; JHA, S.N.; JOSHI, A.B.; THAKUR, G.D.; BISTA, M.B. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, n. 3-4, p. 153-157, 2000.

BEZERRA, G.S.N.; BARBOSA, W.L.; SILVA, E.D.D.; LEAL, N.C.; MEDEIROS, Z.M. Urine as a promising sample for *Leishmania* DNA extraction in the diagnosis of visceral leishmaniasis - a review. **Braz J Infect Dis**, v. 23, n. 2, p. 111-120, 2019.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N.S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S.G.; SKEIKY, Y.A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 249-261, 1999.

BLAINEAU, C.; TESSIER, M.; DUBESSAY, P.; TASSE, L.; CROBU, L.; PAGÈS, M.; BASTIEN, P. A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. **Curr Biol**, v. 17, n. 9, p. 778-782, 2007.

BOELAERT, M.; VERDONCK, K.; MENTEN, J.; SUNYOTO, T.; VAN GRIENSVEN, J.; CHAPPUIS, F.; RIJAL, S. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 6, p. CD009135, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2018**. Brasília: SINAN, Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BURNS, J.M.; SHREFFLER, W.G.; BENSON, D.R.; GHALIB, H. BADARO, R.; REED, S.G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

CABRAL-MIRANDA, G.; DE JESUS, J.R.; OLIVEIRA, P.R.; BRITTO, G.S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DUTRA, R.F.; ALCÂNTARA-NEVES, N.M. Detection of parasite antigens in *Leishmania infantum* - infected spleen tissue by monoclonal antibody, piezoelectric-based immunosensors. **J Parasitol**, v.100, n. 1, p. 73-78, 2014.

CANFAROTTA, F.; CZULAK, J.; BETLEM, K.; SACHDEVA, A; EERSELS, K.; VAN GRIENSVEN, B.; CLEIJ, T.J.; PEETERS, M.A. A novel thermal detection method based on

molecularly imprinted nanoparticles as recognition elements. **Nanoscale**, v. 10, n. 4, p. 2081-2089, 2018.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O.; FERREIRA, L.C.; ROMAÑA, C. Leishmaniose visceral americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose visceral americana em 1936. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321-390, 1937.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **BMJ**, v. 333, n. 7571, p. 723, 2006.

CORDEIRO, T.A.R.; GONÇALVES, M.V.C.; FRANCO, D.L.; REIS, A.B.; MARTINS, H.R.; FERREIRA, L.F. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, 2019.

COSTA, D.N.; CODEÇO, C.T.; SILVA, M.A.; WERNECK, G.L. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2355, 2013.

COURA-VITAL, W.; KER, H.G.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; LEAL, G.G. A.; MOREIRA, N.D.; et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.

CUNNINGHAM, J.; HASKER, E.; DAS, P.; EL SAFI, S.; GOTO, H.; MONDAL, D.; et al. A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 10, p. 1312-1319, 2012.

DA COSTA LIMA, M.S.; HARTKOPF, A.C.L.; DE SOUZA TSUJISAKI, R.A.; OSHIRO, E.T.; SHAPIRO, J.T.; DE FATIMA CEPA MATOS, M.; CAVALHEIROS DORVAL, M.E. Isolation and molecular characterization of *Leishmania infantum* in urine from patients with visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop**, v. 178, p. 248-251, 2018.

DHOM-LEMONS, L.; VIANA, A.G.; CUNHA, J.L.R.; CARDOSO, M.S.; MENDES, T.A.O.; PINHEIRO, G.R.G.; et al. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 2019.

DILIËN, H.; PEETERS, M.; ROYAKKERS, J.; HARINGS, J.; CORNELIS, P.; WAGNER, P.; et al. Label-Free Detection of Small Organic Molecules by Molecularly Imprinted Polymer Functionalized Thermocouples: Toward In Vivo Applications. **ACS Sens**, v. 2, n. 4, p. 583-589, 2017.

EL HARITH, A.; KOLK, A.H.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; HUIGEN, E.; JELSMA, T.; KAGER, P.A. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 7, p. 1321-1325, 1988.

FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. **Iran Biomed J**, v. 20, n. 3, p. 128-134, 2016.

FARIA, A.R.; DE CASTRO VELOSO, L.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B.; DAMASCENO, L.M. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum* - infected dogs. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n. 1, p. e3429, 2015.

GHEDIN, E.; ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R.T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, n. 3, p. 213-218, 1978.

ISLAM, M.Z.; ITOH, M.; TAKAGI, H.; ISLAM, A.U.; EKRAM, A.R.; RAHMAN, A.; TAKESUE, A.; HASHIGUCHI, Y.; KIMURA, E. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 79, n. 4, p. 599-604, 2008.

KHAN, M.G.; ALAM, M.S.; PODDER, M.P.; ITOH, M.; JAMIL, K.M.; HAQUE, R.; WAGATSUMA, Y. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. **Parasit Vectors**, v.3, p. 114, 2010.

MOHAPATRA, T.M.; SINGH, D.P.; SEN, M.R.; BHARTI, K.; SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v.4, n. 2, p. 114-117, 2010.

MOTAZEDIAN, M.; FAKHAR, M.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.; MIKAEILI, F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 60, n. 2, p. 151-154, 2008.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G.G.; GUDERIAN, J.A.; et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 9, 2010.

RAMOS-JESUS, J.; CARVALHO, K.A.; FONSECA, R.A.; OLIVEIRA, G.G.; MELO, S. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N.M.; DUTRA, R.F. A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. **Anal Bioanal Chem**, v. 401, n. 3, p. 917-925, 2011.

SIVAKUMAR, R.; SHARMA, P.; CHANG, K.P.; SINGH, S. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. **Protein Expr Purif**, v. 46, n. 1, p. 156-165, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; VILLANUEVA-SAZ, S.; CARBONELL, M.; TROTTA, M.; FURLANELLO, T.; NATALE, A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 111, 2014.

SOUTO, D. E.; SILVA, J.V.; MARTINS, H.R.; REIS, A.B.; LUZ, R.C.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti - *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biosens Bioelectron**, v. 46, p. 22-29, 2013.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

TAKAGI, H.; ISLAM, M.Z.; ITOH, M.; ISLAM, A.U.; EKRAM, A.R.M.S; HUSSAIN, S.M; HASHIGUCHI, Y.; KIMURA, E. Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 5, p. 902-905, 2007.

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

VALLUR, A.C.; REINHART, C.; MOHAMATH, R.; GOTO, Y.; GHOSH, P.; MONDAL, D.; DUTHIE, M.S.; REED, S.G. Accurate Serodetection of Asymptomatic *Leishmania donovani* Infection by Use of Defined Antigens. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 4, p. 1025-1030, 2016.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Hypnea musciformis*

Rodrigo César Fernandes Barbosa<sup>1</sup>, Marcia Cristina Campos de Oliveira<sup>1</sup>, Aurea Echevarria Aznar Neves Lima<sup>1</sup>, Elisa Cavalcante Pereira<sup>2</sup>, Marcelo Duarte Pontes<sup>3</sup>, Eduardo Caio Torres-Santos<sup>2</sup>, Valter Viana de Andrade-Neto<sup>2</sup>

1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ – Brasil;
2. Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ – Brasil;
3. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), Rio de Janeiro, RJ - Brasil.

### RESUMO

Os mares e oceanos abrigam parte da vida e fornecem metabólitos passíveis de estudos biológicos em diversos modelos de interesse à saúde humana. Entre as macroalgas, aproximadamente 90% dos produtos naturais isolados de Rhodophytas apresentam cloro e/ou bromo em suas estruturas, sendo majoritariamente mono e sesquiterpenos, com relatos de atividade tripanossomicida, leishmanicida, antiviral, antifúngica e anti-helmíntica, o que justificou a avaliação da atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania infantum* e citotoxicidade de extratos e frações da espécie *Hypnea musciformis*. *L. infantum* é uma das espécies responsáveis pela ocorrência da leishmaniose visceral, forma clínica mais severa da doença. Foram testadas concentrações de 0 a 128 µg/mL do extrato bruto e da fração básica de *H. musciformis* contra promastigotas de *L. infantum*. A fração básica (BH) apresentou IC<sub>50</sub> = 63,2 (60,7 - 65,8) µg/mL, enquanto o extrato bruto não apresentou atividade nas concentrações testadas. Através de partição líquido-líquido do extrato bruto e da fração básica, obteve-se as respectivas frações aquosas e hexânicas. A fração metanol/água do extrato bruto (MBH) e a hexânica da fração básica (HBH) apresentaram valores de IC<sub>50</sub> = 41,4 (37,5 - 45,6) e 30,5 (27,2 - 34,1) µg/mL, respectivamente. As demais frações não apresentaram atividade nas concentrações testadas. MBH e HBH foram submetidas à avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais, tendo apresentado valores de CC<sub>50</sub> = 48,2 e 132,8 µg/mL, respectivamente, o que demonstra que HBH apresentou melhor relação atividade/citotoxicidade.

**Palavras-chave:** Algas Marinhas, Leishmaniose Visceral, Produtos Naturais Marinhos.

### ABSTRACT

The seas and oceans are part of life and provide metabolites subject to biological studies in several models of interest to human health. Among the macroalgae, approximately 90% of natural products isolated from Rhodophytas have chlorine and/or bromine in their structures,

being mostly mono and sesquiterpenes, with reports of antitrypanosomal, antileishmanial, antiviral, antifungal and anthelmintic activity, which justified the evaluation of leishmanicidal activity against promastigotes of *Leishmania infantum* and cytotoxicity of extracts and fractions of *Hypnea musciformis* species. *L. infantum* is one of the species responsible for the occurrence of visceral leishmaniasis, more severe clinical form of the disease. Concentrations of 0 to 128 µg/mL of the crude extract and basic fraction of *H. musciformis* were tested against *L. infantum* promastigotes. The basic fraction (BH) showed  $IC_{50} = 63.2$  (60.7 - 65.8) µg/mL, while the crude extract did not show activity at the tested concentrations. Through liquid-liquid partition of the crude extract and the basic fraction, the respective aqueous and hexane fractions were obtained. The methanol/water fraction of the crude extract (MBH) and the hexane of the basic fraction (HBH) presented values of  $IC_{50} = 41,4$  (37,5 - 45,6) and 30.5 (27.2 – 34.1) µg/mL, respectively. The other fractions showed no activity at the tested concentrations. MBH and HBH were submitted to cytotoxicity assessment against peritoneal macrophages, having  $CC_{50} = 48.2$  and 132.8 µg/mL, respectively, which demonstrates that HBH presented the best activity/cytotoxicity ratio.

**Keywords:** Seaweed, Visceral Leishmaniasis and Natural Marine Products.

## 1. INTRODUÇÃO

As macroalgas estão taxonomicamente organizadas em três divisões: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Ochrophyta (algas pardas) (GRAHAM; WILCOX, 2000). Podem ser distinguidas pela sua coloração, ou seja, pela abundância dos pigmentos produzidos. Algas verdes produzem majoritariamente as clorofilas *a* e *b*, o que confere para estas, a coloração verde. Algas pardas produzem as clorofilas *a* e *c*, porém, apresentam carotenoides como os pigmentos mais abundantes, o que confere uma coloração variável entre diferentes tons de marrom. Algas vermelhas possuem clorofila *a*, mas como pigmentos predominantes produzem as ficoeritrinas, de coloração avermelhada, atribuindo-lhes sua coloração característica (SANTIAGO, 2018).

Produtos naturais (PN) de algas marinhas são majoritariamente estudados para a compreensão de seu papel ecológico, e como ferramenta no estabelecimento dos limites taxonômicos de espécies, gêneros e famílias (TEIXEIRA, 2013). No entanto, são pouco explorados em estudos fitoquímicos e farmacológicos, representando assim campo fértil para a descoberta de novos compostos bioativos de interesse para a saúde humana.

Com cerca de 1.500 compostos isolados, as Rhodophytas são as mais estudadas quanto a metabólitos especiais, devido a sua maior abundância e diversidade, se comparadas às demais macroalgas. PN isolados de algas vermelhas apresentam a particularidade da presença frequente de halogênios em seus compostos. Enquanto aproximadamente 90% dos relatos de compostos isolados de algas vermelhas apresentam

bromo e/ou cloro, algas verdes e pardas apresentam um percentual de aproximadamente 7 e 1%, respectivamente. As espécies dos gêneros *Plocamium* e *Laurencia* estão entre as mais estudadas entre as algas vermelhas, caracterizando-se pela produção predominante de mono e sesquiterpenos halogenados (BLUNT et al., 2007).

A dificuldade de equacionar de forma razoável a relação entre bioatividade/toxicidade, que por certos períodos causou desinteresse pela pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais marinhos, hoje é contornado pelo avanço das técnicas de síntese e modelagem molecular, que garantem a independência da indústria frente à escassez dos recursos biológicos, direcionando a utilização de moléculas de origem natural como protótipos no desenvolvimento fármacos sintéticos, onde através de modificações estruturais e avaliação da relação entre estrutura, atividade e toxicidade, possibilitam o desenvolvimento destes, como alternativa viável ao uso das substâncias de origem natural como princípio terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Os metabólitos isolados de espécies do gênero *Laurencia* são os mais estudados, havendo relatos de compostos com atividade tripanossomicida (VEIGA-SANTOS et al., 2010), leishmanicida (SANTOS et al., 2010), antiviral contra o vírus HSV-1, antifúngica (STEIN et al., 2011) e anti-helmíntica (DAVYT et al., 2001).

Segundo Hutson (2012), extratos de *Asparagopsis taxiformis* inibiram em 96% o desenvolvimento embrionário de *Neobenedenia* sp., ectoparasita de importância comercial que acomete cultivos de peixes marinhos, elevando os custos de produção em todo o mundo.

Desta forma, algas vermelhas representam potenciais fontes de compostos que possam servir de modelo para o desenvolvimento de moléculas bioativas de interesse para a saúde humana, o que justifica a escolha da Rhodophyta *Hypnea musciformis* para a avaliação da atividade de seus extratos e frações em promastigotas de *Leishmania infantum*, protozoário responsável pela leishmaniose visceral (LV) em humanos, cães e diversos mamíferos silvestres e sinantrópicos.

A LV, também conhecida como calazar, é causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*. São reconhecidas atualmente como agentes etiológicos da doença a *L. donovani* e a *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo a *L. donovani* responsável pela infecção no Velho Mundo, enquanto *L. infantum* causa a LV no Novo Mundo (SOUZA et al., 2012).

A LV é amplamente distribuída pelo mundo, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Oceania. Atinge aproximadamente 68 países (WHO, 2018), com incidência

anual de aproximadamente 500.000 novos casos e 59.000 óbitos (MALEKI et al, 2016), dos quais no ano de 2018, 95% ocorreram em dez países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A letalidade da doença pode chegar a 95%, caso não seja adotado o tratamento adequado (WHO, 2018).

No Brasil, segundo o Guia de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2017), no ano de 2017 os casos de LV somaram 4.103 ocorrências, o que representa um coeficiente de incidência de 1,98 casos/100.000 habitantes, em 23 Estados das 5 regiões, e um índice de letalidade de 8,8%.

Os fármacos utilizados no combate às leishmanioses podem ser divididos em duas categorias, fármacos de primeira e de segunda escolha. Os fármacos considerados de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, desenvolvidos na década de 1940 e utilizados desde então. Os grandes inconvenientes da utilização destes fármacos são os sintomas causados pela elevada hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, como náuseas, dores abdominais, diarreia e batimentos cardíacos irregulares. Outros fatores limitantes à sua utilização são a resistência crescente e a elevada taxa de mortalidade associada ao seu uso, especialmente em pacientes coinfectados com HIV e tuberculose (COELHO-JÚNIOR et al., 2016).

O principal fármaco considerado de segunda escolha é a anfotericina B. Embora altamente eficaz mesmo em pacientes resistentes aos antimoniais, tem restrições devido à sua toxicidade renal e à administração intravenosa lenta, o que é inconveniente ao paciente (BHANDARI et al., 2012). Como alternativa à toxicidade da anfotericina B convencional, desenvolveu-se uma formulação lipossomal do fármaco, comercializada em pó liofilizado, que apresenta menor toxicidade. Entretanto, seu uso permanece limitado devido ao elevado custo (DORLO et al., 2012).

A pentamidina também é utilizada como fármaco de segunda escolha nos casos de resistência aos antimoniais. Entretanto, este medicamento possui efeitos tóxicos em 30 a 50% dos pacientes tratados, apresentando efeitos adversos graves, como diabetes mellitus, hipoglicemia, miocardite e toxicidade renal, e por isso seu uso é limitado (CROFT; OLLIARO, 2011).

A miltefosina, desenvolvida na década de 1980, é o único fármaco de administração oral utilizado no tratamento de todos os tipos de leishmaniose, de acordo com a regulamentação sanitária de cada país (DORLO et al., 2012). Embora represente via de administração menos invasiva que os demais tratamentos, apresenta efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia e insuficiência renal, além de ser hepatotóxico e

teratogênico (TORRES et al., 2014). No Brasil, o uso da miltefosina é permitido apenas para o combate da leishmaniose visceral canina (LVC).

Tendo em vista os efeitos adversos associados ao uso dos medicamentos de primeira e segunda escolha, a complexidade de suas vias de administração, assim como os altos custos de medicamentos de menor toxicidade como a anfotericina B lipossomal, a busca por novos compostos com potencial atividade leishmanicida e baixa toxicidade vem ao encontro da necessidade de desenvolver tratamentos eficazes e acessíveis à população.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade leishmanicida de extratos e frações da alga vermelha *Hypnea musciformis* em promastigotas de *Leishmania infantum*, assim como sua citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 COLETA DAS MACROALGAS

*H. musciformis* foi coletada através de mergulho livre, nas regiões infralitoral e entremarés da Praia Grande, Ilha de Itacuruçá, no município de Mangaratiba – RJ (Figura 1).



**Figura 1.** Coleta de *H. musciformis*.

O material coletado foi triado para a retirada de sedimentos e organismos associados. Parte do material foi acondicionado em solução de formol a 4% em água do mar, para posterior identificação taxonômica.

## 2.2 PREPARO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Realizou-se a secura de 50 gramas da alga a 55 °C em estufa com circulação de ar da marca Tecnal por 48 horas, sendo esta posteriormente triturada em moinho de facas.

Realizou-se a extração por decocção utilizando 100 mL de uma solução etanol em água (8:2), durante duas horas, a 80 °C, para isto sendo utilizadas 10 gramas da alga seca.

O extrato obtido foi concentrado através de destilação à pressão reduzida, em rotaevaporador Bucchi, equipado com banho ultratermostático Masterfrio e bomba de vácuo Trivac.

É importante ressaltar que o teor de minerais em algas marinhas é consideravelmente alto, composto em sua maior parte por sais de sódio, potássio e cálcio, normalmente variando em torno de 30%, e em determinadas espécies, podendo chegar a 70% em relação ao peso seco da planta (PATARRA, 2008). Na literatura não são relatadas metodologias que tenham levado em consideração o alto teor de minerais, nem que tenham removido estes dos extratos antes da realização dos experimentos de atividades biológicas, de forma a garantir a presença apenas de compostos orgânicos, buscando a otimização das atividades avaliadas. Desta forma, após destilação até secura, o extrato bruto foi ressuspenso em etanol absoluto, e submetido a filtração à vácuo para a remoção dos minerais presentes. Após filtração, os extratos foram novamente concentrados por destilação à pressão reduzida, e os rendimentos calculados. A massa do extrato bruto obtido foi de 2,2 g.

O extrato bruto (cerca de 1g) obtido foi tratado conforme preconizado por Matos (1997), para a obtenção de compostos básicos, como alcaloides, através de extração ácido base. De acordo com esta metodologia, o extrato hidroalcoólico obtido foi acidificado com HCl 1% e filtrado para a exclusão de compostos insolúveis na fase aquosa. Posteriormente, ajustou-se o pH para 10 com NH<sub>4</sub>OH concentrado, seguido de partição líquido-líquido com clorofórmio. Posteriormente a fase orgânica foi separada em funil de decantação, filtrada em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada em rotaevaporador, originando a fração básica.

Extrato bruto e fração básica foram submetidos à partição líquido-líquido, tendo como fase aquosa metanol/água (9:1) e como fase orgânica hexano, gerando as subfrações aquosas e hexânica.

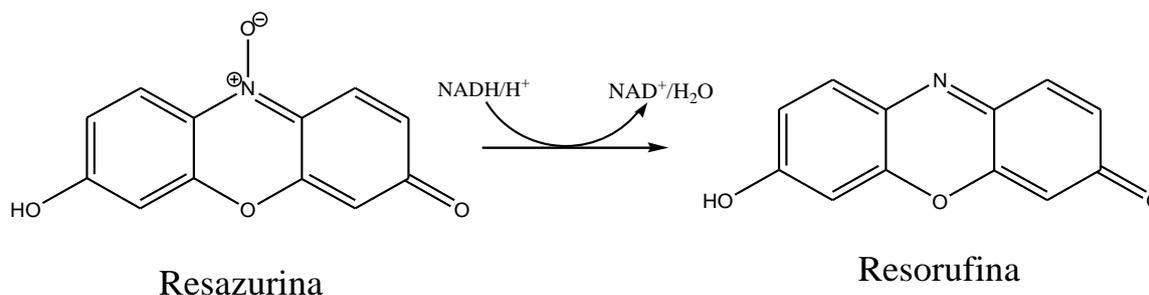
Extrato bruto, fração básica, assim como as subfrações obtidas da extração líquido-líquido, foram testados em promastigotas de *L. infantum*.

## 2.3 MANUTENÇÃO E CULTIVO DOS PARASITOS

Promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26 °C, em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich). Para manutenção dos parasitos foram feitos repiques duas vezes por semana até a quinta passagem. Os parasitos foram rotineiramente obtidos de camundongos BALB/c.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTAS DE *L. infantum*

Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços, com inóculo inicial de  $2,0 \times 10^6$  promastigotas/mL e extratos brutos e frações básicas de *H. musciformis*, com concentrações variando entre 0 e 128 µg/mL. Os parasitos foram incubados a 26 °C por 72 horas. Após esse período, o crescimento parasitário foi avaliado pela adição do reagente fluorimétrico resazurina (Sigma-Aldrich), um corante de coloração azul e não fluorescente, que sob ação de NADPH/NADH redutases, é reduzido a resorufina (Figura 2), produto rosa e altamente fluorescente. Desta forma, a resazurina é um indicador de oxirredução utilizado para estudos de atividade metabólica mitocondrial (WINARTASAPUTRA et al., 1980). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A leitura foi realizada em equipamento Spectra Max GEMINI XPS (Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm.



**Figura 2.** Representação da reação de redução da resazurina à resorufina.

## 2.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (CC<sub>50</sub>) EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

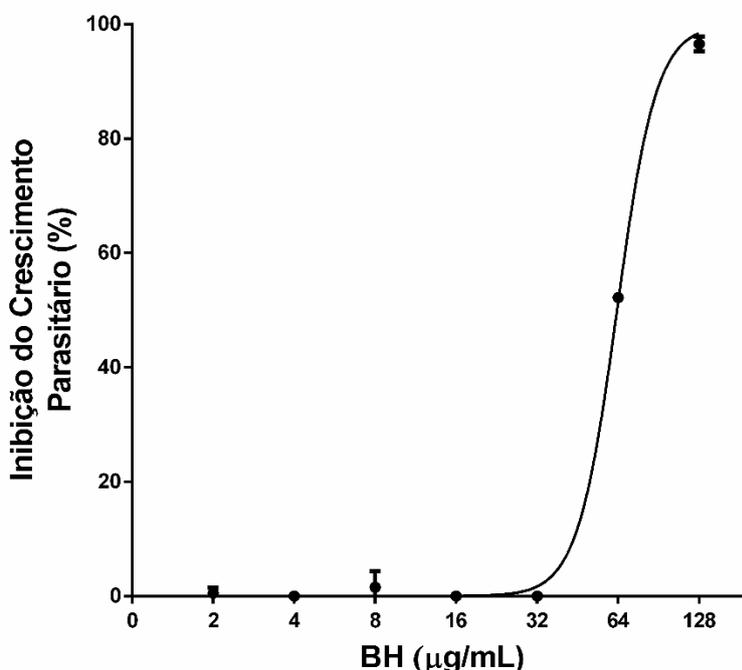
Para avaliar a toxicidade na célula hospedeira, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos não infectados. Os macrófagos foram incubados com os extratos e frações nas concentrações de 0 a 500 µg/mL por 72 horas a 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, a viabilidade celular foi avaliada por fluorimetria, adicionando 50 µM de resazurina por poço. A leitura foi realizada como descrito acima. Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ). Todos os protocolos utilizados estão aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC-020/2015).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração básica (BH) de *H. musciformis* apresentou IC<sub>50</sub> = 63,2 (60,7 – 65,8)\* µg/mL, enquanto o extrato bruto não apresentou atividade contra promastigotas de *L. infantum*, nas concentrações testadas (0 – 128 µg/mL). (\*Intervalo de 95% de confiança para os valores de IC<sub>50</sub>).

Estes resultados corroboram com dados da literatura que descrevem atividades antiparasitárias de extratos de algas do gênero *Hypnea*, como a inibição do crescimento de promastigotas de *L. infantum* por extratos de *Hypnea cornuta* (MINICANTE et al., 2016), de tripomastigotas de *T. cruzi* por extratos de *Hypnea spinella* (SANTIAGO, 2018), entre outros.

Na figura 3 é apresentada a curva de inibição de crescimento parasitário de promastigotas de *L. infantum* por ação da fração BH de *H. musciformes*, a partir da qual foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> (µg/mL).



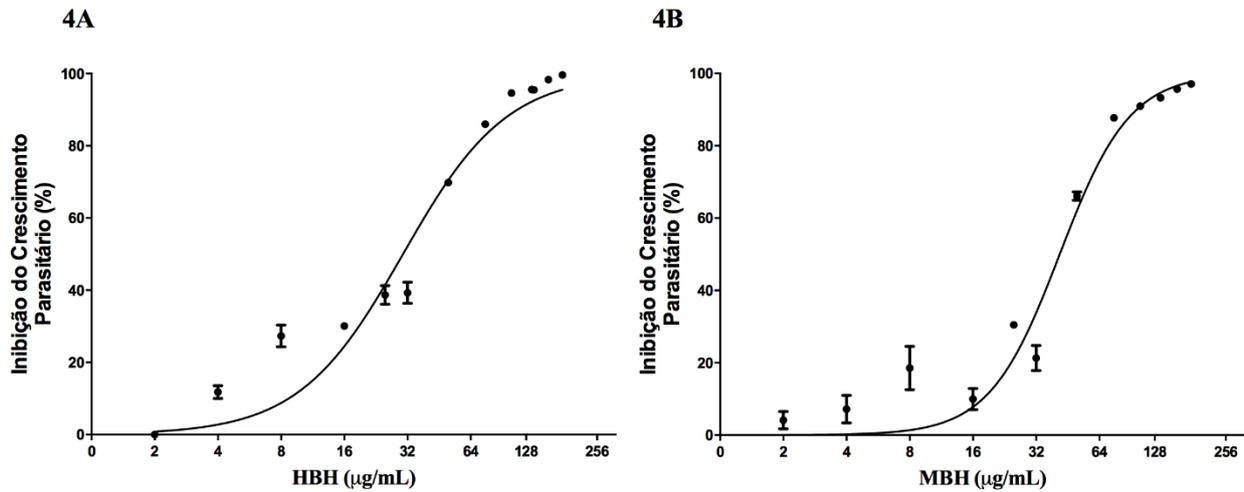
**Figura 3.** Curva de inibição do crescimento de promastigotas *L. infantum* frente à fração BH de *H. musciformis*.

Promastigotas de *L. infantum* foram incubadas em concentrações de 0 a 128 µg/mL da fração básica de *H. musciformis* por 72h, a 26°C. Após este período foi adicionado resazurina, e o resultado expresso em percentual de inibição do crescimento parasitário. O Cálculo do IC<sub>50</sub> foi feito através do programa GraphPad Prism 6.

Após partição líquido-líquido do extrato bruto e da fração BH com metanol/água (9:1) e hexano, verificou-se que a fração hexânica básica (HBH) apresentou IC<sub>50</sub> = 30,5 (27,2 – 34,1) µg/mL e a fração metanólica do extrato bruto (MBH), apresentou IC<sub>50</sub> = 41,4 (37,5 – 45,6) µg/mL (Figura 4A e B).

De acordo com os resultados de atividade contra promastigotas obtidos, foram selecionados para avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos, as frações MBH e HBH.

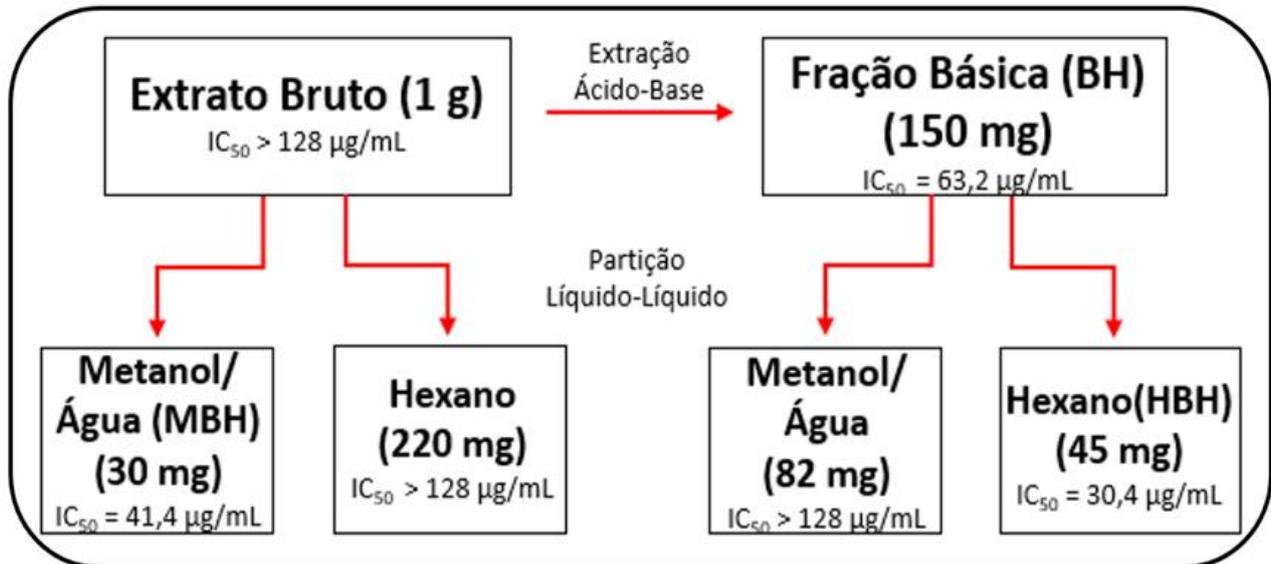
MBH apresentou CC<sub>50</sub> = 48,2 µg/mL, enquanto HBH apresentou CC<sub>50</sub> = 132,8 µg/mL. Os valores de CC<sub>50</sub> obtidos indicam que a fração menos citotóxica, HBH, é também a que demonstrou a maior atividade contra promastigotas de *L. infantum*, o que a torna uma das frações de maior interesse para a avaliação de atividade contra amastigotas intracelulares, levando em conta seus valores de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>.



**Figura 4.** Curva de inibição do crescimento de promastigotas de *L. infantum* frente às frações HBH (4A) e MBH (4B).

Promastigotas de *L. infantum* foram incubadas em concentrações de 0 a 175 µg/mL das frações HBH (4A) e MBH (4B) por 72h, a 26°C. Após este período foi adicionado resazurina, e o resultado expresso em percentual de inibição do crescimento parasitário. O Cálculo do IC<sub>50</sub> foi feito através do programa GraphPad Prism 6.

Na Figura 5 é apresentado o fluxograma de fracionamento de *H. musciformis*, com os respectivos rendimentos e valores de IC<sub>50</sub> das frações obtidas.



**Figura 5.** Fluxograma de fracionamento de *H. musciformis*.

A relação entre citotoxicidade e atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares, denominada índice de seletividade (IS), diz respeito à especificidade de um fármaco em relação ao parasito e ao hospedeiro. Desta forma, a avaliação da citotoxicidade fornece informações necessárias ao planejamento dos experimentos com amastigotas

intracelulares, em relação às concentrações a serem adotadas, uma vez que compostos com valores de  $IS \geq 10$  são considerados promissores (LOPES, 2014), ou seja,  $CC_{50}$  deve ser no mínimo 10 vezes maior que o  $IC_{50}$ , o que significa que o fármaco seria dez vezes mais seletivo para a célula do parasito, que para a do hospedeiro.

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados de atividade contra promastigotas de *L. infantum* e de citotoxicidade em macrófagos peritoneais obtidos reforçam a potencialidade dos produtos naturais marinhos para pesquisa de compostos que possam servir de modelo para o desenvolvimento de fármacos de interesse para a saúde humana.

O fracionamento ácido-base possibilitou a obtenção da fração com a maior atividade leishmanicida e menor citotoxicidade, embora o extrato bruto tenha se mostrado inativo. Este fato chama a atenção para a abordagem dos protocolos a serem adotados durante o fracionamento e isolamento, acerca das classes de compostos que se deseja obter, sobretudo quando os mecanismos de ação e os alvos farmacológicos do modelo a ser testado são conhecidos, visto que via de regra os ensaios de atividades biológicas são interrompidos quando extratos brutos não apresentam os resultados desejados, o que reforça a importância das etapas de fracionamento e isolamento.

Diferentemente de PN terrestres, algas marinhas apresentam em sua composição altos teores de minerais. Desta forma, durante o preparo de extratos hidroalcoólicos, parte considerável dos extratos obtidos são compostos inorgânicos, o que tende a mascarar o rendimento real dos extratos obtidos. Desta forma, a alternativa adotada para a remoção de compostos minerais, que consistiu na ressuspensão dos extratos brutos obtidos em etanol absoluto, seguida de filtração e concentração, mostrou-se como importante ferramenta para o preparo de extratos com concentrações reduzidas de compostos inorgânicos.

A fração HBH mostrou-se a mais promissora para a sequência de fracionamento, isolamento, determinação estrutural e avaliação da atividade leishmanicida e de citotoxicidade dos compostos isolados.

## 5. REFERÊNCIAS

- BHANDARI, V.; KULSHRESTHA, A.; DEEP, D.K., STARK, O., PRAIAPATI, V.; K.; RAMESH, V.; et al. Drug susceptibility in *leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kalazar dermal leishmaniasis. **Plos Neglect Trop**, v. 6, p. 1-6, 2012.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine Natural Products. **Nat Prod Rep**, v.24, n.1, p.31-86, 2007.
- COELHO-JÚNIOR, L.G.; et al, Coinfecção por Leishmaniose Visceral e Vírus da Imunodeficiência Humana: Uma Evolução Clínica Desfavorável. **Rev Patol Trop**, V.45, p.233-240, 2016.
- COSTA-LOTUFO, L.V., WILKE, D. V., JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. **Rev Quim Nova**, v.32, n.3, p.703-716, 2009.
- CROFT, S. L. & OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infec**, v.17, p.1478-1483, 2011.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRU, A.; SALDANÃ, J.; DOMINGUEZ, et al. **Nat Prod**, v.64, p.1552-1555, 2001.
- DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob Chemoth**, v.67, p.2576-3597, 2012.
- GRAHAM, L. E., WILCOX, L. W. **Algae**. Prentice Hall, Michigan, EUA, 2000.
- HUTSON, K.S.; MATA, L.; PAUL, N.A.; NYS, R. Seaweed extracts as a natural control against the monogenean ectoparasite, *Neobenedenia sp.*, infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). **Int. J. Parasitol.** 42, 1135–1141, 2012.
- LOPES, E.O.; OLIVEIRA, C.G.; DEFLON, V.M.; LEITE, C.Q.; PAVAN, F.R. Determinação da atividade antitumoral *in vitro* dos complexos de coordenação contendo os metais Zn(II) e Co(III). **Rev Ciên Farm Básica Apl**, v.35, n.Supl.1, 2014.
- MALEKI, F. et al. In vitro and in vivo susceptibility of *Leishmania major* to some medicinal plants. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.7, n.1, p.37-42, 2016.
- MINICANTE, S. A.; MICHELET, S.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; VITALE, F.; SFRISO, A.; MORABITO, M.; GENOVESE, G. Bioactivity of Phycocolloids against the Mediterranean Protozoan *Leishmania infantum*: An Inceptive Study. **Sustainability**, v.8, n.1131, p.1-9, 2016.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

PATARRA, R. F. **Pesquisa de Ácidos gordos em macroalgas marinhas do litoral de Açores.** (Dissertação) mestrado em Ciências Biomédicas - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Porto, 2008.

SANTIAGO, L. P. T. **Investigação das Atividades Tripanocida e Leishmanicida de Macroalgas Marinhas.** (Dissertação) Mestrado em Biotecnologia Marinha - Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira / Universidade Federal Fluminense, IEAPM/UFF. Arraial do Cabo, 2018.

SANTOS, A. O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Mar Drugs**, v.8, p.2733-2743, 2010.

SOUZA, M. A., NUNES, R. F. F., VIANA, T. C., MARINHO, M. J. M., QUEIROZ, MOREIRA P. V. S., PEREIRA, W. O. Leishmaniose Visceral Humana: do Diagnóstico ao Tratamento. **Rev Cien Saúde Nov Esp**, v.10, p.61-69, 2012.

STEIN, E. M.; ANDREGUETTI, D. X.; ROCHA, C. S.; FUJII, M. T.; BAPTISTA, M. S.; COLEPICOLO, P.; INDIG, G. L. **Rev Bras Farmacogn**, v.21, p.239, 2011.

**SVS/MS. Sistema de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde 2017.** Disponível em <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf> Acessado em 15/03/2020.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Rev Virtual Quim**, v.5, p.343-362, 2013.

TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; SOUZA, R. A.; PIO COLEPICOLO; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Rev Bras Farmacogn**, v.24, p.265-276, 2014.

VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; et al. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v.137, n.11, p.1661-1670, 2010.

**WHO. World Health Organization.** Disponível em [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/) Acessado em 15/03/2020.

**WHO. World Health Organization.** Disponível em <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Acessado em 15/03/2020.

WINARTASAPUTRA, H.; MALLET, V.N.; KUAN, S.S.; GUILBAULT, G.G. Fluorometric and colorimetric enzymic determination of triglycerides (triacylglycerols) in serum. **Clin Chem**, v.26, p.e613, 1980.

## PAPEL DE CALCINEURINAS NA INTERAÇÃO *LEISHMANIA*- MACRÓFAGO

Thalita Camêlo da Silva Ferreira<sup>1</sup>, Cíntia Siess-Portugal<sup>1</sup>, Patrício Reyes Orrego<sup>2</sup>,  
Jorge Enrique Araya<sup>3</sup>, Mauro Cortez<sup>1,3</sup>

1. Imunobiologia da Interação *Leishmania*-macrófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;  
2. Departamento Biomédico, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile;  
3. Laboratório de Parasitologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Tecnologia Médica, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.

### RESUMO

A calcineurina (CaN) é uma proteína heterodimérica formada por uma unidade catalítica e uma unidade regulatória associada à Cálcio (Ca<sup>2+</sup>). Essa fosfatase de serina/treonina dependente de calmodulina-Ca<sup>2+</sup> é funcional em quase todos os eucariotos, incluindo o parasito protozoário *Leishmania spp.*, agente causal da leishmaniose, uma doença tropical negligenciada que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo. Durante o seu ciclo biológico, esse parasito passa por diferentes microambientes e estágios de desenvolvimento. Nesse capítulo, vamos descrever o que se sabe a respeito da estrutura e função de CaN em mamíferos e *Leishmania* e discutir possíveis funções dessa fosfatase na interação entre parasito e macrófago.

**Palavras-chave:** Calcineurina (CaN), *Leishmania* e Macrófago.

### ABSTRACT

Calcineurin (CaN) is a heterodimeric protein consisting of a catalytic subunit and a tightly associated calcium (Ca<sup>2+</sup>)-binding regulatory subunit. This serine/threonine phosphatase dependent of calmodulin-Ca<sup>2+</sup> is functional in almost all eukaryotic cells, including the protozoan parasite *Leishmania spp.*, the causal agent of leishmaniasis, a neglected tropical disease affecting millions of people around the world. During the biological cycle, *Leishmania* parasites go through different harsh environments and life stages. In this chapter, we will describe what is known about the structure and function of CaN in mammals and *Leishmania* and discuss possible roles of these phosphatases in the parasite-macrophage interaction.

**Keywords:** Calcineurin (CaN), *Leishmania* and macrophage.

## 1. INTRODUÇÃO

A função celular é totalmente dependente da homeostase proteica, a qual engloba expressão, modificação pós-traducional, dobramento da estrutura, transporte e degradação de proteínas (DISSMEYER et al., 2019). Entre as modificações pós-traducionais, a fosforilação, a qual consiste na adição de grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ao grupo polar R de aminoácidos, é o mecanismo regulador mais comum. Em eucariotos, fosforilação ocorre principalmente em três aminoácidos contendo um grupo hidroxila: serina, treonina e tirosina. Esse processo é regulado por quinases, enzimas que fosforilam proteínas, e fosfatases, enzimas que hidrolisam ligações fosfo-éster em proteínas fosforiladas. Grupos fosfatos alteram a carga das proteínas, acarretando mudanças conformacionais e funcionais. Fosforilação e desfosforilação são eventos igualmente relevantes nas vias de sinalização e juntos regulam a maioria dos processos celulares básicos: interação proteína-proteína, degradação de proteínas, inibição enzimática, entre outras. Nas células, algumas enzimas são ativadas quando fosforiladas, outras são inativadas (KRAMER, 2016).

As fosfatases, assim como as quinases, são primariamente divididas de acordo com os aminoácidos que modificam: fosfatases de serina/treonina e fosfatases de tirosina (ZHANG, 2002). As fosfatases de serina/treonina pertencem majoritariamente a duas famílias de genes: fosfoproteínas fosfatases (PPPs, do inglês *phosphoprotein phosphatases*) e proteínas fosfatases dependentes de metal (PPMs, do inglês *metal-dependent protein phosphatases*). As fosfoproteínas fosfatases humanas são: PP1, PP2A, PP2B (também conhecida como calcineurina ou PP3), PP4, PP5, PP6 e PP7 (NASA; KETTENBACH, 2018).

A calcineurina (CaN) é a única serina/treonina fosfatase diretamente modulada por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e calmodulina (CaM), uma proteína citoplasmática cálcio-dependente (RUSNAK; MERTZ, 2000). O cálcio é um segundo mensageiro essencial em vias de sinalização que controlam processos diversos em todos os tipos celulares (CLAPHAM, 2007). Portanto, não é surpreendente o fato de que alterações na atividade de CaN estejam envolvidas na patogênese de muitas doenças: hipertrofia cardíaca, cardiopatia congênita, distúrbios imunológicos e neurológicos, e infecções (KLEE; YANG, 2003). Além disso, patógenos, como o parasito *Leishmania*, também possuem uma fosfatase regulada por cálcio homologa à CaN (BANERJEE; SARKAR; BHADURI, 1999).

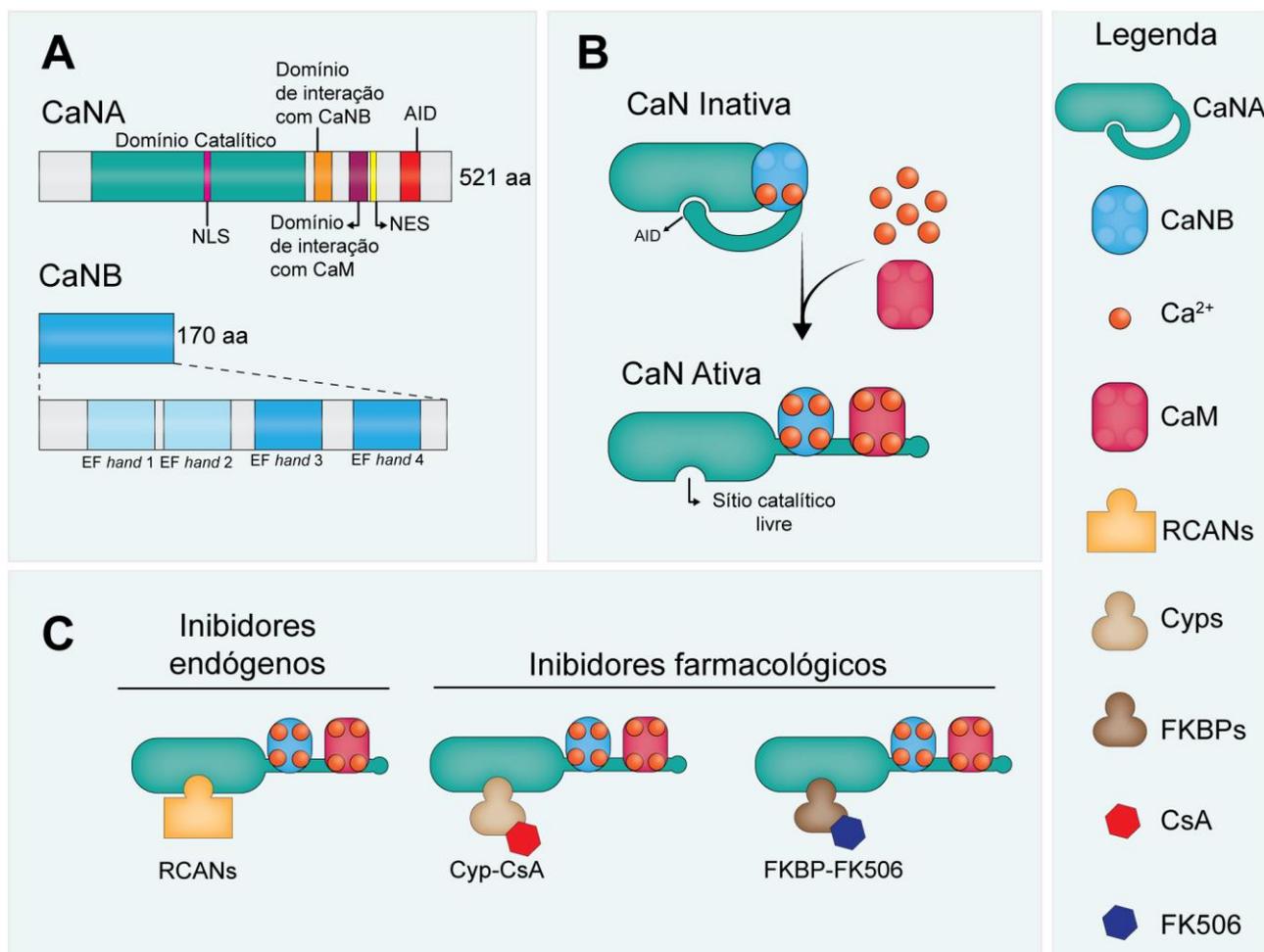
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS CALCINEURINAS

A CaN é uma fosfatase de serina/treonina, altamente conservada em eucariotos, formada por uma subunidade catalítica (CaNA, 57-71 kDa) e uma subunidade regulatória (CaNB, 19-20 kDa) (KLEE; CROUCH; KRINKS, 1979). A CaNA possui um domínio fosfatase N-terminal, seguido por um domínio helicoidal de ligação à CaNB, um motivo de ligação a CaM-Ca<sup>2+</sup> e um elemento auto-inibitório (AID, do inglês *autoinhibitory domain*), que bloqueia o domínio catalítico de ligação ao substrato quando os níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelulares estão baixos. O domínio fosfatase possui dois cofatores metálicos, os cátions Zn<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, e um sinal de localização nuclear (NLS), que permite translocação para o núcleo via importina-β1, sendo que o sinal de exportação nuclear (NES) encontra-se na porção C-terminal. A CaNB, assim como CaM, possui 4 domínios de ligação a cálcio (“*EF hands*”), dois com baixa afinidade (1 e 2) e dois com alta afinidade (3 e 4), e um motivo de miristoilação. Em mamíferos, três isoformas da subunidade catalítica (CaNA $\alpha$ , CaNA $\beta$  e CaNA $\gamma$ ) e duas da subunidade regulatória (CaNB1 e CaNB2) já foram identificadas (RUSNAK; MERTZ, 2000). A figura 1A ilustra os domínios das subunidades de CaN em mamíferos.

A ligação dos quatro cátions Ca<sup>2+</sup> à CaNB e a interação entre CaNA e CaM-Ca<sup>2+</sup> desbloqueiam o sítio catalítico (Figura 1B), permitindo a interação de CaN com substratos e translocação para o núcleo (KISSINGER et al., 1995; PERRINO; NG; SODERLING, 1995). A atividade da CaN é modulada por outros fatores além da oscilação nos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular, incluindo localização subcelular, interação com fatores regulatórios e clivagem intramolecular. A CaN é predominantemente citosólica e pode ser translocada para o núcleo após liberação do sítio catalítico, mas também está presente em diversos compartimentos celulares (retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vesículas sinápticas, microssomas, membrana externa das mitocôndrias e membrana plasmática), e padrões de atividade distintos foram observados no citosol e na membrana plasmática (KIPANYULA; KIMARO; SEKE ET ET, 2016; MEHTA et al., 2014). Adicionalmente, a atividade da CaN é controlada pela modulação na expressão da família de proteínas reguladoras da calcineurina (RCANs), também conhecidas como calcipressinas, que são reguladores endógenos da CaN. As RCANs se ligam diretamente ou próximo ao sítio

catalítico e inibem a fosfatase (GUERRERO-ROS; VALDOR, 2016) (Figura 1C). Por outro lado, a clivagem proteolítica do domínio autoinibitório por calpaína (protease dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) resulta em uma fosfatase ativa independente de calmodulina (LIU et al., 2005; WANG; ROUFOGALIS; VILLALOBO, 1989).



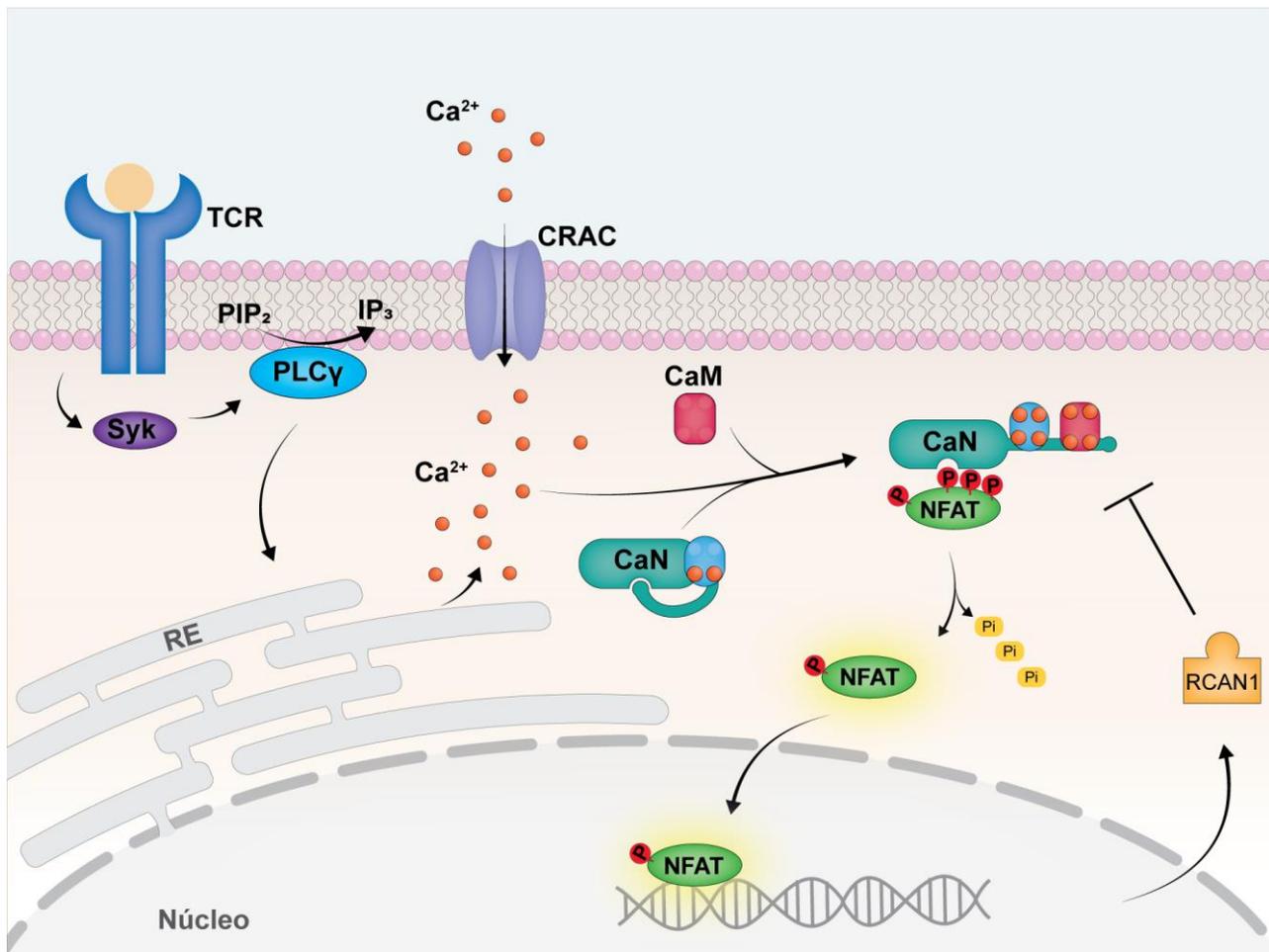
**Figura 1.** Estrutura, ativação e inibição da CaN.

A) Domínios das subunidades CaNA e CaNB representados no sentido N-terminal / C-terminal. B) A ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  e CaM remove o AID do sítio catalítico. C) As proteínas RCANs se ligam a CaN e os complexos Cyp-CsA e FKBP-FK506, bloqueando o sítio catalítico. CaNA: subunidade catalítica A. CaNB: subunidade regulatória B. AID: domínio auto-inibitório. NLS: sinal de localização nuclear. NES: sinal de exportação nuclear. CaM: calmodulina. RCANs: proteínas reguladoras da calcineurina. Cyps: ciclofilinas. FKBP: proteínas ligadoras de FK506. CsA: ciclosporina A. FK506: tacrolimus.

A identificação da CaN como o alvo farmacológico da ciclosporina A (CsA) e do tacrolimus (FK506) evidenciou a relevância clínica dessa fosfatase, impulsionando os estudos das vias de sinalização reguladas pela mesma (LIU et al., 1991). Ambos imunossupressores são moléculas isoladas de fungos usadas no tratamento de doenças

autoimunes e na prevenção de rejeição de órgãos transplantados (BOREL et al., 1976; KINO et al., 1987). Os fármacos CsA e FK506 formam complexos com proteínas denominadas imunofilinas, as quais são classificadas em duas famílias: as ciclofilinas (Cyps, do inglês *Cyclophilins*), que se ligam a CsA, e as proteínas ligadoras de FK506 (FKBPs, do inglês *FK506 binding proteins*), ligantes de FK506 (SCHREIBER, 1991). A maioria das imunofilinas são peptidil-prolil-*cis-trans*-isomerases (PPIs, também conhecidas como rotamases). As PPIs catalisam a interconversão entre as conformações *cis* e *trans* da ligação peptídica que precede a prolina em uma cadeia polipeptídica, assim acelerando o dobramento dos polipeptídios que contém prolina e regulando interações proteína-proteína por meio de mudanças conformacionais (FISCHER; BANG; MECH, 1984). A ligação de CsA e FK506 ao sítio catalítico das PPIs inibe a atividade isomerase, formando complexos (Cyp-CsA e FKBP-FK506) que se ligam à CaN e inibem a atividade da fosfatase (FRIEDMAN; WEISSMAN, 1991; LIU et al., 1991) (Figura 1C). Essa inibição aumenta a fosforilação dos substratos de CaN, incluindo NFAT (do inglês *Nuclear Factor of Activated T-Cells*), que perde atividade transcricional em células T e outras células imunes, culminando no efeito imunossupressor (RAO, 1995).

A inibição da CaN por CsA e FK506 e a superexpressão da subunidade catalítica independente de CaM (CaN $\alpha$ , resíduos 1 a 392) têm sido amplamente utilizadas no estudo dos papéis de CaN na regulação de diversos processos celulares: expressão gênica, homeostase iônica, diferenciação muscular, embriogênese, funções neurológicas, morte celular, entre outros (KLEE; YANG, 2003). A CaN desfosforila diversos substratos, os mais estudados são os fatores de transcrição NAFTs. Uma vez desfosforilados, NAFTs translocam-se para o núcleo, induzindo a expressão gênica de genes-alvo que afetam diversos processos biológicos dependendo do tipo celular (KINGSBURY; CUNNINGHAM, 2000). A figura 2 exemplifica a ativação de NAFT via CaN.



**Figura 2.** Ativação de NFAT via CaN.

A ativação de TCRs recruta Syk, ativando PLC $\gamma$ . A ativação de PLC aumenta os níveis intracelulares livres de Ca $^{2+}$  em várias etapas: a hidrólise do fosfatidilinositol (PI) -4,5 bisfosfato (PIP $_2$ ) pelo PLC produz inositol-1,4,5 trifosfato (IP $_3$ ); o IP $_3$  se liga aos receptores IP $_3$  (IP $_3$ R) no retículo endoplasmático e promove um breve pico de Ca $^{2+}$ , esgotando as reservas de Ca $^{2+}$  do ER; essa depleção aciona um processo de entrada de Ca $^{2+}$  por meio dos canais CRAC (do inglês *Ca $^{2+}$  release-activated Ca $^{2+}$  Chanel*) na membrana plasmática. A ligação dos quatro cátions Ca $^{2+}$  à CaNB e a interação entre CaNA e a calmodulina, também ligada a quatro cátions Ca $^{2+}$ , desbloqueiam o sítio catalítico, permitindo a interação de CaN com NAFT. CaN ativada desfosforila três fososerinas em NFAT, o qual é translocada para o núcleo e regula a transcrição de genes alvos, incluindo RECAN1, que funciona como um *feedback* negativo, inibindo CaN. A inibição da via da CaN-NFAT diminui a produção de citocinas das células T e limita a liberação de interleucinas.

## 2.2 PAPEL DAS CALCINEURINAS EM MACRÓFAGOS

Os macrófagos são amplamente distribuídos por órgãos e tecidos, sua principal função é fagocitar e destruir patógenos, bem como células mortas. A ativação dos macrófagos ocorre pela interação de moléculas microbianas (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como os receptores do tipo Toll (TLRs). Após ativação, todos os TLRs (exceto TLR3) recrutam a proteína adaptadora MyD88 e o ativador *upstream* comum (IRAK / TRAF6

e TAK1) das vias NF- $\kappa$ B (do inglês *Factor Nuclear kappa B*) e MAPKs (do inglês *mitogen-activated protein kinases*), que controlam a expressão de várias citocinas inflamatórias (EL-ZAYAT; SIBAIL; MANNAA, 2019). Os imunossupressores CsA e FK506 também inibem NFAT em macrófagos de camundongos não ativados, mas ativam NF- $\kappa$ B e MAPK (CONBOY et al., 1999; KANG et al., 2007). Esses dados indicam que CaN é um regulador positivo da sinalização via TCR e um regulador negativo da sinalização via TLR. A desfosforilação de NFAT por CaN é bem estabelecida, mas os alvos da fosfatase nas vias NF- $\kappa$ B e MAPK são desconhecidos.

Segundo Kang e colaboradores (2007), CaN reduz a ativação da via clássica de NF- $\kappa$ B por meio da inibição dos adaptadores essenciais MyD88 e TRIF, mas não há relato de fosforilação de serina/treonina nessas proteínas (KANG et al., 2007). Por outro lado, em estudos com células HEK-293T, Shinzawa e colaboradores (2015) mostraram interação entre CnA $\alpha$ /CnA $\beta$  e NIK, indicando que CaN poderia atuar desfosforilando os substratos de NIK (SHINZAWA et al., 2015). Adicionalmente, Pang e colegas (2018) relataram aumento na fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  em macrófagos deficientes para o regulador da calcineurina 1 (RCAN1) (PANG et al., 2018). Já Escolano e colaboradores (2014) reportaram que deleção de CaN em macrófagos reduz os níveis de MKP-1 e aumenta ativação de p38, induzindo uma população de macrófagos anti-inflamatória (ESCOLANO et al., 2014). Apesar dos estudos realizados, os substratos desfosforilados por CaN envolvidos nas vias de NF- $\kappa$ B e MAPK permanecem obscuros, mas é possível inferir que CaN ajuda a manter essas vias inativas.

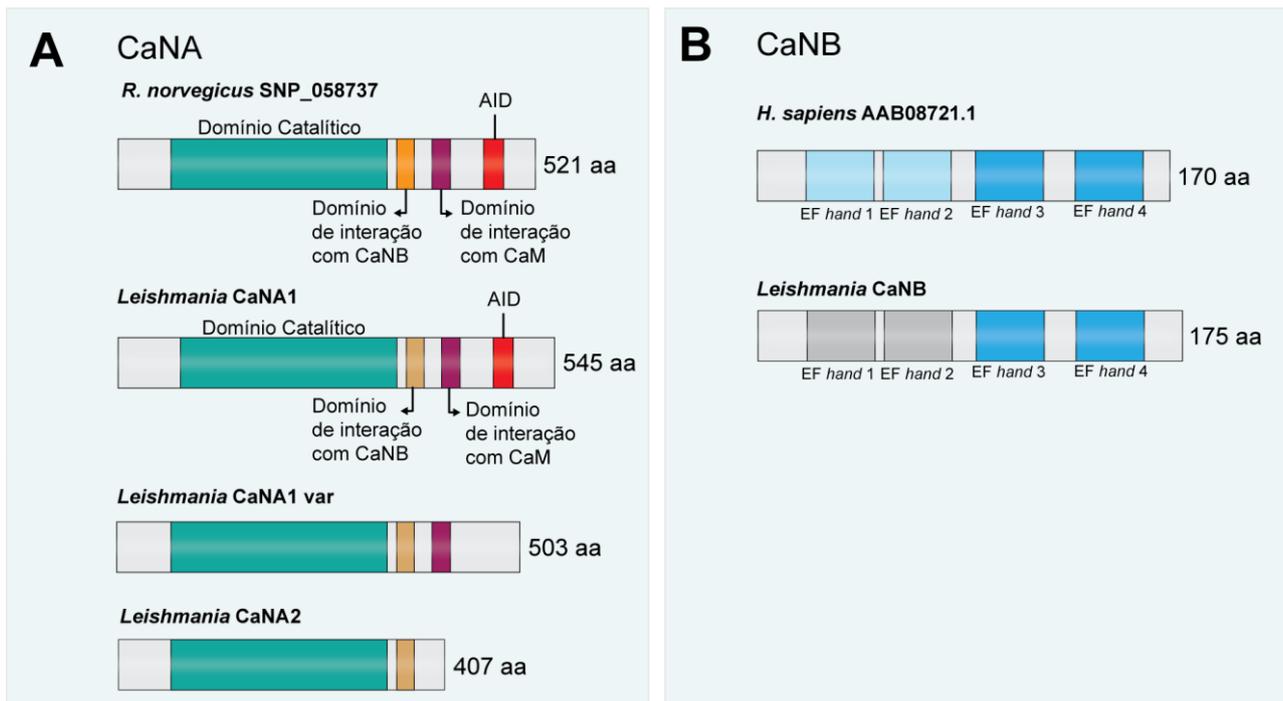
### 2.3 CALCINEURINAS DE *Leishmania* SPP.

O Ca<sup>2+</sup> é um segundo mensageiro envolvido em diversas funções celulares em tripanossomas: diferenciação entre estágios, infecção da célula hospedeira, osmorregulação, manutenção do citoesqueleto e regulação da morte celular programada (RAMAKRISHNAN; DOCAMPO, 2018). A homeostase desse íon envolve uma rede complexa de sinalizações composta por várias proteínas. Assim como outros eucariotos, o parasito *Leishmania* apresenta uma fosfatase de serina/treonina dependente de Ca<sup>2+</sup> e calmodulina (BANERJEE; SARKAR; BHADURI, 1999). *Leishmania major* apresenta dois genes para CaNA, *LmjF36.1980* e *LmjF26.2530*, mas apenas o último codifica a subunidade catalítica contendo todos os domínios clássicos, diferente de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, os quais não possuem CaNA contendo todos os domínios

(ARAYA et al., 2008; MORENO et al., 2007; ORREGO et al., 2014). Já o único gene para CaNB codifica uma subunidade regulatória conservada, apresentando os 4 domínios de ligação a cálcio (“*EF hands*”) (MORENO et al., 2007).

Investigamos a estrutura da CaN de *Leishmania spp.* realizando uma análise *in silico* na base de dados Tritypdb (ASLETT et al., 2010). As proteínas descritas para *L. major* foram usadas como base para selecionar sequências de aminoácidos com uma similaridade superior a 90%. A sequência de CaNA mais caracterizada para mamíferos é a isoforma alfa de *Rattus norvegicus* (NP\_058737). Fizemos uma análise comparativa usando o BLAST de duas sequências (ALTSCHUL et al., 1997, 2005) e alinhamento múltiplo mediante *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011). Os resultados indicam que *Leishmania spp.* possui três isoformas de CaNA, mas apenas uma possui todos os domínios: de ligação à CaNB, de ligação à CaM e AID (Figura 3A). Além disso, a estrutura do domínio catalítico difere na sequência de aminoácidos quando comparado à proteína de *Rattus norvegicus*, o que pode significar um funcionamento diferencial de CaN de mamíferos em relação à CaN de *Leishmania*. No caso de CaNB, a sequência obtida foi comparada com a sequência de aminoácidos de *Homo sapiens* (AAB08721.1) usando o sítio Scan-Prosite: <https://prosite.expasy.org/scanprosite/> (DE CASTRO et al., 2006). Da mesma forma que seu homólogo em mamíferos, todas as sequências da subunidade reguladora possuem quatro motivos *EF-hand* típicos, sendo dois com alta afinidade a  $Ca^{2+}$  idênticos aos de mamíferos e dois com baixa afinidade a  $Ca^{2+}$  que apresentam diferenças na sequência de aminoácidos (Figura 3B). Curiosamente, os dados de investigações sobre o papel de CaN em *Leishmania* diferem segundo o modelo experimental e espécie do parasito.

A deleção de CaNB ( $\Delta$ CaNB) em *L. major* não afeta o crescimento de promastigotas a 27°C, nem a metaciclogênese (NADERER; DANDASH; MCCONVILLE, 2011). Todavia, esses parasitos se tornam mais sensíveis a elevações de temperatura (34°C) e perturbações na composição da membrana lipídica. Ademais, promastigotas  $\Delta$ CaNB apresentam atraso na diferenciação intracelular para amastigotas e não proliferaram em macrófagos, culminando na incapacidade de estabelecer uma infecção *in vivo* (NADERER; DANDASH; MCCONVILLE, 2011). Esse trabalho indica que CaN está envolvida na termotolerância e sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero.



**Figura 3.** Estrutura das subunidades de CaN de *Leishmania* spp.

A) Comparação entre CaNA de *R. norvegicus* e as isoformas de *Leishmania* spp. Há diferenças na sequência de aminoácidos do domínio de interação com CaNB. B) Comparação entre CaNB de *H. sapiens* AAB08721.1 e CaNB de *Leishmania* spp. Há diferenças na sequência de aminoácidos dos domínios EF hand 1 e 2, os quais apresentam baixa afinidade com  $Ca^{2+}$ . Representação no sentido N-terminal – C-terminal. CaNA: subunidade catalítica A. CaNB: subunidade regulatória B. AID: domínio auto-inibitório. CaM: calmodulina. aa: aminoácidos.

Parasitas da espécie *Leishmania infantum* resistentes ao Glucantime<sup>®</sup>, fármaco usado no tratamento de pacientes humanos (DE MELO; FORTALEZA, 2013), apresentam baixos níveis de mRNA de CaN (BAGHER KHADEM ERFAN *et al.*, 2013). O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular está envolvido no processo de apoptose em *Leishmania* (SHAHA, 2006; SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). Baseado nisso, Bagher Khadem Erfan (2013) e colaboradores acreditam que a ativação de CaN está relacionada à ativação da apoptose no parasito e sugerem que baixos níveis de expressão de CaN aumentam a sobrevivência do parasito resistente ao Glucantime<sup>®</sup> por meio da inibição do processo de apoptose (BAGHER KHADEM ERFAN *et al.*, 2013).

Mukhopadhyay e colaboradores (2017) estudaram o papel da CaN e calmodulina na regulação da motilidade flagelar de *Leishmania donovani*. Os promastigotas foram tratados com inibidores específicos de CaN (CsA e inibidor de calcineurina VIII) e calmodulina (sulfonamida W7) e os movimentos flagelares analisados por videomicroscopia de alta velocidade. Os tratamentos induziram batimentos ciliares e interromperam o batimento flagelar, indicando que a sinalização mediada por CaN e calmodulina é antagônica à

sinalização por cAMP (adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato) no movimento flagelar, o que pode estar relacionado à manutenção do equilíbrio entre as duas formas de movimento, essencial na resposta a mudanças ambientais, sobrevivência e virulência do parasito (MUKHOPADHYAY; DEY, 2017).

A CsA reduz a carga parasitária em camundongos Balb/c infectados com *L. major* (SOLBACH; FORBERG; RÖLLINGHOFF, 1986). Curiosamente, o tratamento direto de promastigotas não afeta o crescimento nem a capacidade de infecção, mas o tratamento de macrófagos infectados inibe a proliferação intracelular (BOGDAN et al., 1989; MEISSNER et al., 2003). Apesar da interação entre CsA e Cyps do parasito, o complexo CsA-Cyp não é capaz de inibir a CaN do parasito ou da célula hospedeira (RASCHER et al., 1998). Esses dados apontam que CsA inibe a proliferação de *L. major* por meio de um mecanismo que envolve CaN ou Cyps da célula hospedeira. De fato, já foi demonstrado que a inibição da transcrição de CypA em macrófagos murinos inibe a replicação intracelular de *L. major*, indicando o envolvimento de ciclofilinas do hospedeiro na sobrevivência do parasito (HOERAUF et al., 1997).

Em oposição ao observado no modelo de infecção *in vivo* de *L. major*, CsA agrava o quadro de infecção por *L. donovani* em camundongos C57BL/10, C57L/J e C57BL/6 (OLIVIER; PROULX; TANNER, 1989; OLIVIER; TANNER, 1989; ADINOLFI; BONVENTRE, 1990). Esse contraste pode ser devido às diferenças envolvidas na patogênese causada pelas espécies e nos modelos experimentais. Na leishmaniose cutânea, causada por *L. major*, a ausência de linfocinas diminui a migração de células hospedeiras ao local de infecção, prejudicando o desenvolvimento da lesão. Já no modelo de leishmaniose visceral, a infecção é iniciada na região peritoneal, onde há muitos macrófagos teciduais, desse modo a inibição da produção de IFN- $\gamma$  agrava a infecção por *L. donovani* (ADINOLFI; BONVENTRE, 1990).

Yau e colaboradores (2010) avaliaram o efeito de CsA em promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. Em promastigotas (26°C), a despeito da viabilidade celular não ser afetada, houve inibição reversível da proliferação e indução de mudanças morfológicas (amastigotas-like, sem alteração no padrão de LPG). Já em amastigotas (37°C), o tratamento com CsA afetou drasticamente a viabilidade celular. Curiosamente a toxicidade é dependente da temperatura de incubação do parasito: a viabilidade de promastigotas é afetada pelo inibidor a 37°C, enquanto amastigotas passam a ser resistentes na temperatura de 26°C, demonstrando uma ligação direta entre CaN ou Cyps do parasito e termotolerância. A ciclofilina LmaCyp40 foi identificada como um alvo direto

de CsA, baseado na interação entre a enzima e o inibidor, o que ocasiona a inibição da atividade PPlase da LmaCyP40. O mesmo trabalho ainda reportou que FK506 também inibe a proliferação de ambas as formas do parasito *L. donovani*, mas a viabilidade celular dos amastigotas é menos afetada (IC<sub>50</sub> 15-20 µM) quando comparada com o efeito da CsA (IC<sub>50</sub> 7 µM) (YAU *et al.*, 2010).

Em síntese, fica evidente que CaN do parasito *Leishmania* está envolvida em mais de um processo biológico e sua função pode variar de acordo com a espécie e estágio do parasito.

## 2.4 INTERAÇÃO *Leishmania*-MACRÓFAGO E O PAPEL DAS CALCINEURINAS

Durante seu ciclo biológico complexo, o parasito *Leishmania* é exposto a mudanças de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes, resultando em adaptações morfológicas e bioquímicas importantes para sobrevivência no inseto vetor e no hospedeiro mamífero (SANTOS *et al.*, 2008). Os macrófagos são as principais células hospedeiras e desempenham um papel central na imunobiologia da *Leishmania* (HANDMAN; BULLEN, 2002). Ao fagocitar o parasito, os macrófagos são ativados e apresentam fenótipos dependentes da combinação de fatores inflamatórios e anti-inflamatórios (MURAILLE; LEO; MOSER, 2014). Apesar das várias publicações sobre o papel de CaN em *Leishmania*, não encontramos investigações sobre a função da fosfatase do parasito ou da célula hospedeira na interação *Leishmania*-macrófago.

Os macrófagos fagocitam os patógenos e após reconhecimento de DAMPs por TLRs, ocorre a ativação da via CaN-NFAT (FRIC; ZELANTE; RICCIARDI-CASTAGNOLI, 2014). Essa sinalização ativa a resposta imunocelular do macrófago visando a destruição do patógeno e recrutamento de outras células para o foco de infecção (BARTON; KAGAN, 2009). Nesse contexto, ocorre uma resposta rápida e eficiente, com produção de moléculas líticas como radicais reativos de oxigênio (ROS, do inglês, *Radical Oxygen Species*) e óxido nítrico (NO, do inglês, *Nitric Oxide*), e citocinas induzidas pela via NF-κB (MOURÃO-SÁ *et al.*, 2011).

Por outro lado, amastigotas de *Leishmania* induzem vários mecanismos que inibem o macrófago (CALEGARI-SILVA *et al.*, 2015; CORTEZ *et al.*, 2011). Entre esses mecanismos, vale citar que, na infecção por *L. donovani*, o parasito induz prostaglandina E2, molécula inibitória da atividade microbicida (SEREZANI *et al.*, 2007). A produção de prostaglandina E2 é dependente da ativação da via de sinalização CaN/NAT, além da

ativação de receptores do tipo toll 2 (TLR2) e vias de sinalização dependente de PI3 kinase/Fosfolipase C (BHATTACHARJEE et al., 2016).

Já foi reportado que CaN é importante na regulação da fusão fagossoma/lisossomo em infecções por *Mycobacterium spp.* A CaN é ativada por coronina-1, molécula associada com o fagossoma contendo a bactéria (JAYACHANDRAN et al., 2007), impedindo a maturação do fagossoma em fagolisossoma (RUSSELL, 2001; VERGNE et al., 2005). Promastigotas metacíclicos de *Leishmania* induzem a formação de vacúolos parasitóforos (VPs), mas evitam a fusão com lisossomos até diferenciação em amastigotas, formas resistentes ao conteúdo dos lisossomos (COURRET et al., 2002). A diferenciação em amastigotas é induzida por mudanças no microambiente do VP, como aumento de temperatura e acidificação no interior dos VPs (ALCOLEA et al., 2010). Após estabelecimento da infecção, a célula controla a proliferação do parasito, ativando o sistema imune inato, ou ocorre multiplicação intracelular e posterior infecção de outras células, permitindo a progressão da infecção até gerar a doença. Esse balanço é influenciado principalmente pela espécie de parasito e sua habilidade de adaptar-se ao microambiente no interior das células (SILVEIRA, 2019). Nesse momento chave, a CaN de *Leishmania* pode participar na virulência do parasito, o seu papel na termotolerância dependendo da forma biológica (promastigota ou amastigota) é um forte indicativo (NADERER; DANDASH; MCCONVILLE, 2011; YAU et al., 2010).

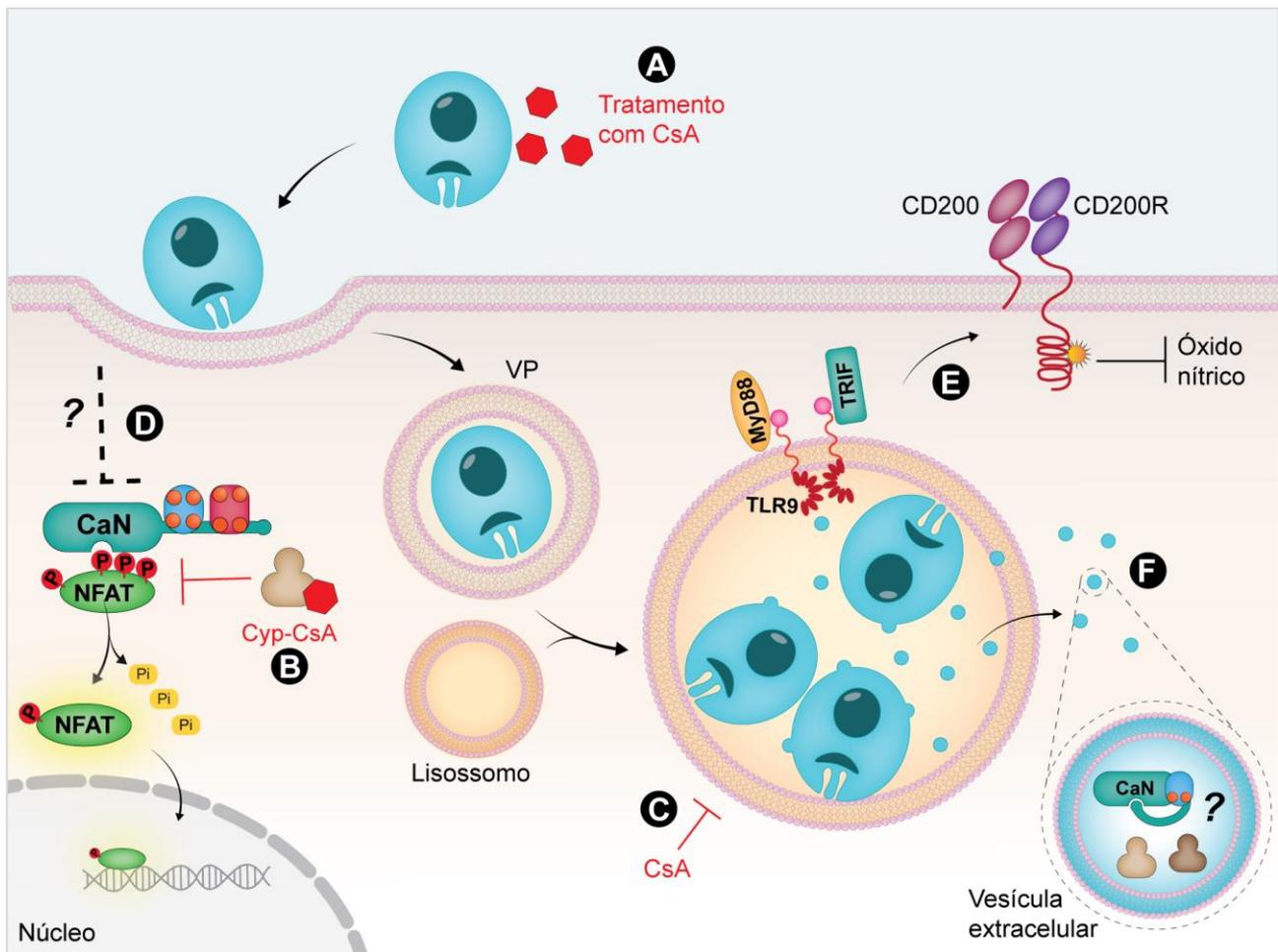
A *Leishmania amazonensis* difere de outras espécies em vários aspectos, o que o torna um excelente modelo de estudo. Enquanto os amastigotas da maioria da espécies residem e multiplicam em vacúolos individuais, a *L. amazonensis* forma vacúolos compartilhados gigantes (OKUDA et al., 2016). Além disso, estudos demonstram que amastigotas de *L. amazonensis* são mais resistentes à morte intracelular (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004; QI et al., 2004), sugerindo que esse parasito possui mecanismos exclusivos para evadir a resposta microbida de macrófagos (KIMA, 2007).

Um dos mecanismos de evasão de *L. amazonensis* é a indução do ligante inibitório CD200 no macrófago infectado (CORTEZ et al., 2011). CD200 é uma glicoproteína de membrana que se liga ao receptor de CD200 (CD200R), presente em células como macrófagos, ativando uma sinalização que culmina na inibição da resposta efetora do macrófago (WRIGHT et al., 2000). Recentemente, foi demonstrado que fagocitose de amastigotas viáveis de *L. amazonensis* induz CD200 em macrófagos por meio da via de sinalização TLR9/MyD88/TRIF, a qual é ativada por microvesículas contendo DNA liberadas pelo parasito (SAUTER et al., 2019). O aumento nos níveis de Ca<sup>2+</sup> está

relacionado com a liberação de vesículas extracelulares em diferentes tipos celulares (MARCHALAND et al., 2008; TAYLOR et al., 2020). Sendo assim, dada a relação direta entre  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e atividade de CaN, é possível sugerir que CaN de *Leishmania* poderia estar envolvida na liberação de vesículas extracelulares. De fato, há trabalhos que associam a sinalização de CaN/NFAT com o empacotamento de exossomos e regulação de microRNAs em modelos de atrofia muscular (FRY, 2014; HUDSON et al., 2014).

Ainda é preliminar a inferência que CaN seja liberada pelo parasito em vesículas extracelulares, podendo atuar tanto na célula hospedeira como em outro parasito. Mas há trabalhos que abordam a secreção de CaN, geralmente dosando níveis de CaN no soro em diferentes patologias (CAO et al., 2018; SUN et al., 2020). Adicionalmente já foi demonstrado que ciclofilinas do parasito são liberadas e agem na célula hospedeira (BUKRINSKY, 2015; DITIATKOVSKI et al., 2015), indicando que outras moléculas como CaN podem ser liberadas em vesículas extracelulares produzidas pelo parasito.

Mais estudos devem ser realizados com a finalidade de esclarecer a relevância das CaNs na interação entre *Leishmania* e macrófagos, mas podemos levantar algumas hipóteses baseadas na literatura (Figura 4). O pré-tratamento de parasitos com CsA, bem como o tratamento de células infectadas inibem a proliferação intracelular de *Leishmania* (NADERER; DANDASH; MCCONVILLE, 2011). Devido a possíveis efeitos *off-target* da CsA (ANDERSON et al., 2016), há necessidade de mais estudos com deleção e superexpressão gênica para afirmar se a inibição da multiplicação e sobrevivência do parasito intracelular ocorre pela inativação da atividade isomerase de Cyps ou inativação da fosfatase CaN. Tendo em vista que calcineurina é importante para impedir a formação do fagolisossoma na infecção por *Mycobacterium* spp. (JAYACHANDRAN et al., 2007), talvez a forma amastigota de *Leishmania* iniba a via CaN-NAFT para promover a fusão do VP com lisossomos, levando à maturação do VP e multiplicação intracelular. De outro ponto de vista, CaN do parasito pode estar relacionada à quantidade e conteúdo de secreção de vesículas extracelulares, as quais são requeridas para a ativação de mecanismos de evasão como a indução de CD200 (SAUTER et al., 2019). Essas vesículas podem conter Cyps e CaN e modular vias em parasitos vizinhos ou na célula hospedeira.



**Figura 4.** Possíveis funções das CaNs na interação *Leishmania*-macrófago.

O pré-tratamento de parasitos com CsA (A) ou o tratamento de células infectadas (B) inibem a proliferação intracelular (C). Amastigotas poderiam inibir a via CaN-NFAT e promover a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos (D). CaN pode estar envolvida na liberação de vesículas extracelulares do parasito e modular a indução de CD200 (E). Essas vesículas extracelulares podem conter Cyps e CaN que influenciam parasitos vizinhos e a célula hospedeira (F). CsA: ciclosporina A. VP: vacúolo parasitóforo.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade das calcineurinas está diretamente ligada aos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular, e juntos regulam vias de sinalização essenciais em diversos processos celulares em eucariotos, incluindo parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*. Durante seu ciclo biológico, o parasito *Leishmania* alterna entre promastigota e amastigota para se adaptar ao microambiente do flebotomíneo e ao hospedeiro mamífero, respectivamente. Essas mudanças morfológicas estão diretamente relacionadas com exposição a fatores de estresse intrínsecos de cada ambiente. Na infecção de células de mamífero, ocorre uma adaptação rápida do parasito a fim de resistir às defesas microbidas da célula. Levando

em consideração que  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel chave na diferenciação entre estágios dos tripanossomas, é muito importante investigar a função de CaNs do parasito nesse processo de adaptação, bem como as diferenças entre CaNs de diferentes espécies de *Leishmania*, o que pode implicar diferenças funcionais. Além disso, é de extrema prioridade estudar a relevância desses achados na fisiopatologia da doença. Apesar dos efeitos *off-target*, os fármacos CsA e FK506 são ferramentas chave nos estudos de CaN, assim como estratégias moleculares de superexpressão ou deleção do gene de subunidades. Estudos futuros serão realizados, focando nas diferenças de localização e função de CaN nas diferentes formas biológicas de *Leishmania* (promastigotas e amastigotas), assim como na caracterização estrutural e molecular de CaN nas diferentes espécies de *Leishmania*.

#### 4. AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado pela FAPESP (Projeto no 2012/24105-3), CNPq (Projeto Universal no 443816/2014-0), pela CAPES (Código financeiro 001). Agradecemos também ao projeto MINEDUC-UA (*Ministerio de Educación de Chile, Universidad de Antofagasta*), código ANT1856, e à Union Iberoamericana de Universidades (UIU - edital 1054, 2<sup>nd</sup> *Research Collaboration Fund* 2019) pelo suporte.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADINOLFI, L. E.; BONVENTRE, P. F. Cyclosporin A treatment converts *Leishmania donovani*-infected C57BL/10 (curing) mice to a noncuring phenotype. **Infection and immunity**, v. 58, n. 9, p. 3151–3, 1990.

ALCOLEA, P. J.; et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC genomics**, v. 11, p.e31, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–402, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **The FEBS journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–9, 2005.

ANDERSON, S. J.; et al. Off-Target drug effects resulting in altered gene expression events with epigenetic and “Quasi-Epigenetic” origins. **Pharmacological research**, v. 107, p. 229–

233, 2016.

ARAYA, J. E.; et al. Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. **Microbes and infection**, v. 10, n. 8, p. 892–900, 2008.

ASLETT, M.; et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, 2010.

BAGHER KHADEM ERFAN, M. et al. Downregulation of Calcineurin Gene Is Associated with Glucantime(®) Resistance in *Leishmania infantum*. **Iranian journal of parasitology**, v. 8, n. 3, p. 359–66, 2013.

BANERJEE, C.; SARKAR, D.; BHADURI, A. Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein phosphatase from *Leishmania donovani*. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 6, p. 567–73, 1999.

BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 535–42, 2009.

BHATTACHARJEE, A.; et al. *Leishmania donovani*-Induced Prostaglandin E<sub>2</sub> Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2-Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> Signaling. **Infection and immunity**, v. 84, n. 10, p. 2963–73, 2016.

BOGDAN, C.; et al. Cyclosporin A enhances elimination of intracellular *L. major* parasites by murine macrophages. **Clinical and experimental immunology**, v. 75, n. 1, p. 141–6, 1989.

BOREL, J. F.; et al. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. **Agents and actions**, v. 6, n. 4, p. 468–75, 1976.

BUKRINSKY, M. Extracellular cyclophilins in health and disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 10, p. 2087–95, 2015.

CALEGARI-SILVA, T. C.; et al. The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF-κB p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. **Open biology**, v. 5, n. 9, p. 150118, 2015.

CAO, J.L.; et al. Correlation between Serum Calcineurin Activity and Left Ventricular Hypertrophy in Hypertensive Patients and Its Clinical Significance. **Cardiology**, v. 139, n. 2, p. 124–131, 2018.

CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1047–1058, 2007.

CONBOY, I. M.; et al. Calcineurin and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase modulate macrophage effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6324–9, 1999.

CORTEZ, M.; et al. *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. **Cell host & microbe**, v. 9, n. 6, p. 463–71, 2011.

COURRET, N.; et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 11, p. 2303–16, 2002.

DE CASTRO, E.; et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. **Nucleic acids research**, v. 34, n.

Web Server issue, p. W362-5, 2006.

DE MELO, E. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Public Health Perspective. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

DISSMEYER, N.; et al. PROTEOSTASIS: A European Network to Break Barriers and Integrate Science on Protein Homeostasis. **Trends in biochemical sciences**, v. 44, n. 5, p. 383–387, 2019.

DITIATKOVSKI, M.; et al. Inhibition of extracellular cyclophilins with cyclosporine analog and development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 353, n. 3, p. 490–5, 2015.

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAIL, H.; MANNAA, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 187, 2019.

ESCOLANO, A.; et al. Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. **The EMBO journal**, v. 33, n. 10, p. 1117–33, 2014.

FISCHER, G.; BANG, H.; MECH, C. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. **Biomedica biochimica acta**, v. 43, n. 10, p. 1101–11, 1984.

FRIC, J.; ZELANTE, T.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Phagocytosis of Particulate Antigens - All Roads Lead to Calcineurin/NFAT Signaling Pathway. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 513, 2014.

FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 799–806, 1991.

FRY, C. S. Tiny transporters: how exosomes and calcineurin signaling regulate miR-23a levels during muscle atrophy. Focus on “miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export”. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 306, n. 6, p. C529-30, 2014.

GUERRERO-ROS, I.; VALDOR, R. **Regulators of Calcineurin**. In: CHOI, S. (Ed.). Encyclopedia of Signaling Molecules. Second Edition. Suwon, Korea: Springer International Publishing, 2016. p. 4537–4546.

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

HOERAUF, A.; et al. Host-cell cyclophilin is important for the intracellular replication of *Leishmania major*. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 2, p. 421–9, 1997.

HUDSON, M. B.; et al. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 306, n. 6, p. C551-8, 2014.

JAYACHANDRAN, R.; et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 37–50, 2007.

KANG, Y. J.; et al. Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways.

**Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 7, p. 4598–607, 2007.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–96, 2007.

KINGSBURY, T. J.; CUNNINGHAM, K. W. A conserved family of calcineurin regulators. **Genes & development**, v. 14, n. 13, p. 1595–604, 2000.

KINO, T.; et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **The Journal of antibiotics**, v. 40, n. 9, p. 1249–55, 1987.

KIPANYULA, M. J.; KIMARO, W. H.; SEKE ETET, P. F. The Emerging Roles of the Calcineurin-Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes Pathway in Nervous System Functions and Diseases. **Journal of aging research**, v. 2016, p. 5081021, 2016.

KISSINGER, C. R.; et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. **Nature**, v. 378, n. 6557, p. 641–4, 1995.

KLEE, C. B.; CROUCH, T. H.; KRINKS, M. H. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 12, p. 6270–3, 1979.

KLEE, C. B.; YANG, S.-A. **Calcineurin**. In: Handbook of Cell Signaling. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 631–636.

KRAMER, IJ. M. **Protein Phosphatases**. In: Signal Transduction. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 935–995.

LIU, F.; et al. Truncation and Activation of Calcineurin A by Calpain I in Alzheimer Disease Brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37755–37762, 2005.

LIU, J.; et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 807–15, 1991.

MARCHALAND, J.; et al. Fast subplasma membrane Ca<sup>2+</sup> transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 37, p. 9122–32, 2008.

MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological reviews**, v. 201, p. 206–24, 2004.

MEHTA, S.; et al. Calmodulin-controlled spatial decoding of oscillatory Ca<sup>2+</sup> signals by calcineurin. **eLife**, v. 3, p. e03765, 2014.

MEISSNER, U.; et al. Cyclosporin A-mediated killing of *Leishmania major* by macrophages is independent of reactive nitrogen and endogenous TNF-alpha and is not inhibited by IL-10 and 13. **Parasitology research**, v. 89, n. 3, p. 221–7, 2003.

MORENO, V. R.; et al. The Calcineurin A homologue from *Trypanosoma cruzi* lacks two important regulatory domains. **Acta tropica**, v. 101, n. 1, p. 80–9, 2007.

MOURÃO-SÁ, D.; et al. CLEC-2 signaling via Syk in myeloid cells can regulate inflammatory

- responses. **European journal of immunology**, v. 41, n. 10, p. 3040–53, 2011.
- MUKHOPADHYAY, A. G.; DEY, C. S. Role of calmodulin and calcineurin in regulating flagellar motility and wave polarity in *Leishmania*. **Parasitology research**, v. 116, n. 11, p. 3221–3228, 2017.
- MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–13, 2014.
- NADERER, T.; DANDASH, O.; MCCONVILLE, M. J. Calcineurin is required for *Leishmania major* stress response pathways and for virulence in the mammalian host. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 2, p. 471–80, 2011.
- NASA, I.; KETTENBACH, A. N. Coordination of Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatase Activities in Mitosis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 30, 2018.
- OKUDA, K.; et al. *Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous Vacuole Maturation. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005669, 2016.
- OLIVIER, M.; PROULX, C.; TANNER, C. E. Importance of lymphokines in the control of multiplication and dispersion of *Leishmania donovani* within liver macrophages of resistant and susceptible mice. **The Journal of parasitology**, v. 75, n. 5, p. 720–7, 1989.
- OLIVIER, M.; TANNER, C. E. The effect of cyclosporin A in murine visceral leishmaniasis. **Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, v. 40, n. 1, p. 32–8, 1989.
- ORREGO, P. R.; et al. A cytoplasmic new catalytic subunit of calcineurin in *Trypanosoma cruzi* and its molecular and functional characterization. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2676, 2014.
- PANG, Z.; et al. Regulator of calcineurin 1 differentially regulates TLR-dependent MyD88 and TRIF signaling pathways. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197491, 2018.
- PERRINO, B. A.; NG, L. Y.; SODERLING, T. R. Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 1, p. 340–6, 1995.
- QI, H.; et al. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 988–95, 2004.
- RAMAKRISHNAN, S.; DOCAMPO, R. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Signaling. **Genes**, v. 9, n. 6, p.304, 2018.
- RAO, A. NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. **Journal of leukocyte biology**, v. 57, n. 4, p. 536–42, 1995.
- RASCHER, C.; et al. *Leishmania major* parasites express cyclophilin isoforms with an unusual interaction with calcineurin. **The Biochemical journal**, v. 334 ( Pt 3, p. 659–67, 1998.

- RUSNAK, F.; MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1483–521, 2000.
- RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 8, p. 569–77, 2001.
- SANTOS, V. C.; et al. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): PH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 17, p. 2792–2798, 2008.
- SAUTER, I. P.; et al. TLR9/MyD88/TRIF signaling activates host immune inhibitory CD200 in *Leishmania* infection. **JCI insight**, v. 4, n. 10, 2019.
- SCHREIBER, S. L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. **Science (New York, N.Y.)**, v. 251, n. 4991, p. 283–7, 1991.
- SEREZANI, C. H.; et al. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 37, n. 5, p. 562–70, 2007.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 233–44, 2006.
- SHINZAWA, M.; et al. Catalytic subunits of the phosphatase calcineurin interact with NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and attenuate NIK-dependent gene expression. **Scientific reports**, v. 5, p. 10758, 2015.
- SIEVERS, F.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, p. 539, 2011.
- SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniases so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019.
- SOLBACH, W.; FORBERG, K.; RÖLLINGHOFF, M. Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in *Leishmania major*-infected, genetically susceptible BALB/c mice. **Infection and immunity**, v. 54, n. 3, p. 909–12, 1986.
- SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 27, p. 25120–32, 2003.
- SUN, Y.; et al. The elevated serum levels of calcineurin and nuclear factor of activated T-cells 1 in children with Kawasaki disease. **Pediatric rheumatology online journal**, v. 18, n. 1, p.e23, 2020.
- TAYLOR, J.; et al. Ca<sup>2+</sup> mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. **Journal of extracellular vesicles**, v. 9, n. 1, p. 1734326, 2020.
- VERGNE, I.; et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4033–4038, 2005.
- WANG, K. K.; ROUFOGALIS, B. D.; VILLALOBO, A. Characterization of the fragmented

forms of calcineurin produced by calpain I. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 67, n. 10, p. 703–711, 1989.

WRIGHT, G. J.; et al. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. **Immunity**, v. 13, n. 2, p. 233–242, 2000.

YAU, W.L.; et al. Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e729, 2010.

ZHANG, Z.Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 42, p.209–234, 2002.

## TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES: DO ABANDONO À RESISTÊNCIA - UM DESAFIO QUE PERMANECE

Anna Fernandes Silva Chagas Do Nascimento<sup>1</sup>, Dilvani Oliveira Santos<sup>2</sup>

1. Universidade Federal Fluminense (UFF), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA), Niterói - Rio de Janeiro, Brasil;

2. Universidade Federal Fluminense (UFF), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA), Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia (PPBI), Niterói - Rio de Janeiro, Brasil.

### RESUMO

O tratamento das Leishmanioses teve seu início graças a Gaspar Vianna que, em 1912, iniciou o uso do tártaro emético. Desde então, aconteceram mudanças na composição química dos antimoniais -drogas de primeira escolha- de trivalentes para pentavalentes. Embora os antimoniais sejam eficientes na redução do número de casos ativos, o número de casos de resistência vêm aumentando, principalmente por ser o mesmo medicamento utilizado há mais de 80 anos. Para os casos de segunda escolha são utilizados os fármacos Anfotericina B e a Miltefosina, que também possuem um grande número de registros de resistência do protozoário. Esse capítulo aborda de maneira cronológica o tratamento das Leishmanioses, dos primeiros fármacos utilizados até os mais recentes.

**Palavras-chave:** Leishmanioses, Formas de tratamento e Abandono e resistência.

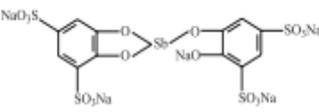
### ABSTRACT

The treatment of Leishmaniasis was firstly discovered by Gaspar Vianna who, in 1912, through the emetic tartar use. Since then, there have been changes in the chemical composition of antimonials - drugs of first choice - from trivalent to pentavalent. Although antimonials are effective in reducing the number of active cases, the number of resistance cases has been increasing due to the abandon of the treatment, consequent to the huge cytotoxicity of it. The other drugs, Amphotericin B and Miltefosine are used for second-choice cases and, also, present high level of protozoan resistance records. This chapter discuss the forms of the treatment of Leishmaniasis, from the first drugs used to the most recent ones.

**Keywords:** Leishmaniasis, Forms of treatment and Abandonment and resistance

## 1. INTRODUÇÃO

No ano de 1912, Gaspar Vianna iniciou o uso do tártaro emético na terapia contra a Leishmaniose Cutânea (VIANNA, 1912 Apud REZENDE; GASPARG, 2008). Apesar da substituição e da mudança química que os antimoniais trivalentes sofreram, até os antimoniais pentavalentes - Glucantime®, os efeitos colaterais severos atribuídos ao seu uso, permanecem até os dias atuais (Figuras 1 e 2). Dentre eles, pode-se citar a intolerância gastrointestinal, efeitos cardiotóxicos bem como outros efeitos citotóxicos, motivos esses que levam, na grande maioria das vezes, ao abandono do tratamento pelo paciente. No ano de 1936, foi introduzido por Schmidt, o gluconato de antimônio sódico, comercializado, ainda hoje, como Pentostam®. A dose para as drogas de primeira escolha, são de 10-20 mg do antimônio/kg peso, via intramuscular, por 20 dias, sem interrupção. Sendo assim, o motivo de abandono do tratamento está na sua difícil e dolorosa administração assim como seus efeitos deletérios. Alguns postos de saúde, quando não apresentam o conhecimento necessário para diagnóstico imediato, podem gerar um diagnóstico tardio com conseqüente, variação na dose do tratamento prescrita ao paciente. A longo prazo, esses efeitos podem causar resistência ao tratamento e sobrecarga dos rins, principais órgãos responsáveis pela excreção do fármaco (RATH et al., 2003, SANTOS et al., 2008, LYRIO et al., 2017).

| Fórmula estrutural   | Nome químico/<br>Nome comercial  |
|--|--|
| $\left[ \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CO} \\   \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\   \\ \text{HCO} \\   \\ \text{COOH} \end{array} \right] \text{K}$ | Tartarato de antimônio e potássio <sup>16</sup><br><br>Tártaro emético                               |
|   | Antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico <sup>16</sup><br><br>Stibophen, Repodral, Fuadina |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_2^- \text{S} \\   \\ \text{O}=\text{C} - \text{O} \end{array} \text{Sb} - \text{S} - \text{CH}_2\text{COONa}$                            | Tioglicolato de sódio e antimônio <sup>16</sup>  |

**Figura 1.** Composição química dos antimoniais trivalentes utilizados (RATH et al., 2003)

| Fórmula estrutural proposta   | Nome químico<br>Nome comercial   |
|---|--|
| $  \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HOCH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{HCOH} \\    \\  \text{CH}_2\text{OH}  \end{array}  \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^-  $  | Antimoniato de<br>N-metilglucamina <sup>14</sup><br><br>Glucantime®;<br>Antimoniato de<br>meglumina                            |
| $  \left[ \begin{array}{c}  \text{CH}_2\text{OH} \quad \text{CH}_2\text{OH} \\    \quad \quad   \\  \text{CHOH} \quad \text{CHOH} \\    \quad \quad   \\  \text{HCO} \quad \text{OCH} \\    \quad \quad   \\  \text{HCO} \quad \text{OCH} \\    \quad \quad   \\  \text{COO}^- \quad \text{COO}^-  \end{array} \right] \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}  $ | Gluconato de<br>antimônio (V)<br>sódico <sup>14, 17</sup><br>ou Estibogluconato<br>de sódio<br><br>Pentostam®<br>Solustibosan® |
| $  \begin{array}{c}  \text{OH} \\    \\  \text{O} = \text{Sb} - \text{CH}_3 \\    \\  \text{C}_6\text{H}_4 \\    \\  \text{NH-CO-NH}_2  \end{array}  $  | Uréia estibamina <sup>16</sup><br><br>Estibamine®  |

**Figura 2.** Composição química dos antimoniais pentavalentes (RATH et al., 2003)

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

As drogas usadas no tratamento das leishmanioses apresentam vários problemas, incluindo toxicidade elevada e muitos efeitos adversos, levando à retirada de pacientes de tratamento e, em alguns casos, ao surgimento de cepas resistentes. Outro fator importante de ser considerado é que Leishmanioses são, de fato, um complexo de doenças tais como Leishmaniose visceral, Leishmaniose cutânea e Leishmaniose mucocutânea dentre outras formas e, por essas razões, são doenças com diferentes respostas clínicas o que faz, por exemplo, com que antimoniais pentavalentes representem um problema face aos processos de cura dos pacientes. Os problemas incluem o acúmulo de drogas em tecidos como baço e fígado, mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, e até mesmo a resistência adquirida a esses compostos, que podem levar à redução ou retirada do tratamento (LYRIO et al., 2017). Além das preocupações que incluem os custos, graus de toxicidade e via de administração no tratamento atual das leishmanioses, também existe o problema da frequência de resistência.

Pentamidina, anfotericina B e paromomicina (Quadro 1) são os medicamentos usados como segunda opção para o tratamento das Leishmanioses em casos de resistência, apesar de sua grande toxicidade para o hospedeiro (OLLIARO et al., 1993; BRAY et al., 2003; SINGH et al., 2004, SANTOS et al., 2008, LYRIO et al., 2017). A resistência à pentamidina também foi descrita na literatura (RATH et al., 2003, SANTOS et al., 2008, LYRIO et al., 2017), bem como as dificuldades no seu uso como tratamento de pacientes imunodeprimidos (por exemplo, infectados pelo HIV), nos quais os medicamentos convencionais são menos eficientes e doses mais altas de medicamentos e tempo prolongado de tratamento são comumente utilizados (RAMOS et al., 1990).

Apesar dos avanços científicos, já ocorridos em busca de melhorias na fórmula de seus fármacos, atualmente, a maioria dos medicamentos disponíveis para o tratamento das Leishmanioses são injetáveis e de alta toxicidade. Sendo assim, torna-se essencial o investimento na busca de novas drogas capazes de reduzir essa citotoxicidade, diminuir a dificuldade de administração e que vise a redução dos casos de resistência (SANTOS et al., 2008, PELISSARI et al., 2011, LYRIO et al., 2017).

A miltefosina é administrada por via oral, portanto mais fácil de indicação para tratamento das Leishmanioses, principalmente em crianças e, é o único medicamento já liberado para uso de tratamento dos cães infectados, (LYRIO et al., 2017). Entretanto, este medicamento não é muito eficaz em casos humanos e, em caninos (hospedeiro importante dentro da cadeia epidemiológica no Brasil), realiza apenas a cura clínica, reduzindo a carga parasitária, fazendo com que os cães possam ser assintomáticos para a doença. É necessária a avaliação clínico - laboratorial do cão de 4 em 4 meses para ser acompanhado o efeito deste medicamento, podendo causar o abandono do tratamento pelo dono do cão ou negligência em seu acompanhamento, principalmente pelo custo elevado de cada dose (OLLIARO et al., 1993; BRAY et al., 2003). Assim, os cães continuam sendo uma importante fonte de infecção da Leishmaniose Visceral, mesmo quando medicados, trazendo uma importante questão ética a este respeito, a eutanásia. Com relação as vacinas, estas podem gerar imunização dos cães em áreas endêmicas diminuindo a infecção em humanos. A vacina Leishmune® desenvolvida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) é composta por glicoproteínas de promastigotas de *Leishmania donovani* (SANTOS. 2007) no entanto, foi retirada do mercado por causar resistência parasitária e casos falsos positivos. Atualmente, a vacina disponível é a Leishtec®, desenvolvida pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e composta por amastigotas de *L. donovani* (FOROUGHIPARVAR, 2014), porém de alto custo. Para todas as formas clínicas das Leishmanioses

existe uma forma específica de dosagem e/ou medicamento mais indicado, caso esse procedimento não seja seguido pode-se aumentar os casos de resistência parasitária, super - dosagem, elevada toxicidade do tratamento para o paciente e, em casos extremos, o óbito (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

**Quadro 3.** Relação entre os tratamentos utilizados em humanos e quadros clínicos das Leishmanioses

| Forma clínica da doença   | Medicação indicada  |  |
|---|---|--|
|   | Primeira escolha  | Segunda escolha  |
| Leishmaniose cutânea (exceto por <i>L. guyanensis</i> )               | Antimoniato de meglumina por 20 dias. Anfotericina B lipossomal para gestantes e maiores de 50 anos | Anfotericina B desoxicolato ou Isotionato de pentamidina (exceto em gestantes e lactantes) |
| Leishmaniose cutânea causada por <i>L. guyanensis</i>                 | Não responde bem ao Antimoniato de meglumina. Usar Isotionato de pentamidina                        | Antimoniato de meglumina   |
| Leishmaniose cutânea disseminada (casos de até 10 lesões ulcerativas) | Antimoniato de meglumina por 30 dias  | Isotionato de pentamidina  |
| Leishmaniose cutânea difusa (casos de anergia e lesões infiltradas)   | Isotionato de pentamidina   | Antimoniato de meglumina por 25 dias   |
| Leishmaniose mucosa   | Antimoniato de meglumina por 30 dias combinado com pentoxifilina                                    | Reduzir a dose de antimoniato e utilizar por 40 dias                                       |
| Leishmaniose visceral   | Antimoniato de meglumina por 20 dias em casos não complicados                                       | Anfotericina B lipossomal  |

Fonte: (PIMENTEL et al., 2011; WERNECK et al., 2011; MARINHO et al., 2017)

No Brasil, em relação à Leishmaniose visceral (LV), antimoniato de meglumina e a anfotericina B são os medicamentos utilizados para o tratamento dessa enfermidade (Quadro 1). A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e comorbidades. A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e

de pacientes que tenham contra-indicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes (MISHRA et al., 1994 Apud BRASIL, 2011).

A anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, com ação nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MISHRA et al., 1992; MISHRA et al., 1994; THAKUR et al., 1993; THAKUR et al., 1997.; THAKUR; NARAYAN, 2004 Apud BRASIL, 2011). A experiência clínica acumulada com seu uso no tratamento da LV vem aumentando ao longo dos últimos anos. Tem sido demonstrado que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia, com conseqüente diminuição de sua toxicidade (CARVALHO, 2000 Apud BRASIL, 2011). Atualmente, duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, com eficácias comparáveis, sendo que esta última apresentou menor toxicidade em trabalhos desenvolvidos na Índia (THAKUR et al., 1996; MEYERHOFF, 1999 Apud BRASIL, 2011). As recomendações para a escolha do medicamento para tratamento da LV devem levar em consideração o perfil de toxicidade das drogas.

As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores associados à morte na LV (ANDRADE; ROCHA, 1990; SANTOS et al., 2002; WERNECK et al., 2003; COLLIN et al., 2004 Apud BRASIL, 2011; BRASIL, 2017). A identificação precoce dos pacientes que poderão evoluir com gravidade é de fundamental importância para reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas profiláticas e terapêuticas oportunas. Observa-se para o Brasil, nos anos de 2001 a 2008, que a letalidade atinge principalmente os pacientes com faixa etária menor de 1 ano e com 50 anos ou mais de idade.

Nos últimos tempos, a LV reapareceu no mundo de forma preocupante (ZIJLSTRA et al., 1991; WERNECK et al., 2002; COLLIN et al., 2004; PISCOPO; AZZOPARDI, 2007 Apud BRASIL, 2011; BRASIL, 2017). No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades (COSTA; ARAUJO, 1990; COSTA et al., 1995; MENDES et al., 2002; GUERRA et al., 2004; DANTAS-TORRES; BRANDAO-FILHO, 2006 Apud BRASIL, 2011; BRASIL, 2017) e a doença tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes com AIDS, à semelhança do que se observa no sul da Europa. Apesar dos esforços no controle de vetores e reservatórios, a LV encontra-se em rápida expansão territorial, acometendo indivíduos de diferentes grupos de idades (BRASIL, 2011). Estima-se que, aproximadamente 0,2-0,4 e 0,7-1,2 milhões de novos casos de a Leishmaniose visceral (LV) e a Leishmaniose cutânea (LC) ocorrem a cada ano, respectivamente. De acordo com

Alvar et al. (2012) existe uma estimativa de 20.000 a 40.000 mortes anuais resultantes das Leishmanioses.

Para a LV, foi abolido o uso da Anfotericina B desoxicolato devido aos altos índices de letalidade e toxicidade para o paciente (WERNECK et al., 2011). Apesar disso, essa continua sendo a forma clínica mais fácil de ser tratada, uma vez que embora a regressão da distensão abdominal possa demorar, os fármacos usados como primeira e segunda escolha são normalmente efetivos. Para as outras formas clínicas há ainda maior caso de resistência parasitária, sendo o uso de doses mais baixas e por tempo prolongado (5mg/kg/de 10 dias em 10 dias) a maneira alternativa de administração desses remédios, tentando minimizar a exposição do paciente com a toxicidade química do tratamento (WERNECK et al., 2011). Para as Leishmanioses, o critério de cura é apenas clínico, uma vez que há evidências experimentais que o parasito se mantém, por vezes, “escondidos” no interior de fibroblastos (BOGDAN et al., 2000). A Leishmaniose Cutânea possui como critério de cura a epitelização total em até 90 dias após o tratamento, sendo acompanhado por mais 180 dias. A falha terapêutica somente é considerada após a segunda tentativa de tratamento sem sucesso (WERNECK et al., 2011).

O tratamento das Leishmanioses com Antimoniato de meglumina apresenta um grande número de casos de óbito no Brasil, principalmente pelo fato de que o paciente não morre com a forma cutânea da doença, mas acaba morrendo com os efeitos adversos do tratamento. Sua eficácia é variável e existe uma grande dificuldade de comparação entre os estudos por cada localidade e, pelo fato de que alguns postos de saúde administram o tratamento, de forma diferente, sem padronização (PIMENTEL et al., 2011). A perspectiva para seu uso seria de doses mais baixas e via intralesional a cada 15 dias, por ser mais direto e menos prejudicial que uma injeção sistêmica. Para a Anfotericina B, ainda existe uma alta toxicidade e alteração do metabolismo glicídico do paciente, podendo induzir diabetes mellitus (PIMENTEL et al., 2011). A perspectiva de seu uso seria o ajuste correto da dose (7mg/ kg/ dose + mesilato 4mg/kg/dose) e um número reduzido de aplicações (PIMENTEL et al., 2011). Como alternativa a esses medicamentos poderia ser utilizado paramomicina em gel, termoterapia ou novos tratamentos alternativos menos tóxicos. A anfotericina B lipossomal é parenteral, sendo passada para o feto durante a gravidez e altamente tóxico para o paciente, podendo ter como perspectiva para seu uso em casos de Leishmaniose Visceral a formulação de medicamentos via oral. Por fim, a miltefosina apresenta ainda uma alta taxa de resistência e não efetiva para tratamentos de LV (PIMENTEL et al., 2011).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro do contexto acima exposto, o investimento em pesquisas científicas que levem a descoberta de novos fármacos promissores para o tratamento das Leishmanioses e, sem efeitos citotóxicos para as células animais, contribuirá para formas alternativas de tratamento desse complexo de doenças e, poderá reduzir o número de casos de abandono e resistência ao tratamento pelos pacientes. Sendo assim, é importante que o candidato ao fármaco de escolha tenha características como: eficácia na fase assintomática e sintomática da doença, compostos ativos facilmente isolados (caso seja um produto natural), baixa toxicidade, baixo custo, fácil administração, farmacocinética adequada e solubilidade. Vale ainda ressaltar que os produtos naturais encontram-se ganhando destaque como forma terapêutica para Leishmanioses, como a literatura reporta, apresentando atividade farmacológica contra diversas doenças parasitárias, diminuindo os efeitos deletérios observados nos tratamentos tradicionais das Leishmanioses.

### 4. REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS One**, v.7, n.5, p.e35671, 2012.

BOGDAN C, D.N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M.G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **Journal Experimental Medicine**, v.191, n.12, p.2121-2130, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília, DF. **Leishmaniose visceral – Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, 2017.

BRAY, P.G.; BARRET, M.P.; WARD, S. A. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitology**, v.19, n.1, p.232-239, 2003.

LYRIO, E.; et al. **Leishmanioses – biodiversidade dos agentes etiológicos, tratamento espécie-específico e distribuição geográfica**. Editora PerSe, 1ª. Edição, São Paulo, 2017.

FOROUGHIPARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, v.9, n. 1, p. 31- 45, 2014.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical Progress and New Drugs for Changing Patterns of Leishmaniasis. **Parasitology Today**, v.9, n.1, p. 323-328, 1993.

PIMENTEL, M.I.; BAPTISTA, C.; FIGUEIREDO, R. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n. 2, p. 32-39, 2011.

MARINHO, R.S.S.; RAMOS, C.J.B.; TEIXEIRA, V.L. Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against equine herpesvirus. **Journal Applied Phycology**, v.29, n.1, p. 552-555, 2017.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da arte. **Quimica Nova**, v.26, n.4, p.550-555, 2003.

RAMOS, H.; COHEN, B.E.; MILHAUD, J. Enhanced Action of Amphotericin B on *Leishmania mexicana* Resulting from heat Transformation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.8, n. 2, p.1584-1589, 1990.

REZENDE, J.M. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. **Ética Revista**, v.5, n.1, p.21-22, 2008.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Cróton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.6, n.1, p.1895-1901, 2003.

SANTOS, D.O.; et al. Leishmaniasis Treatment - A Challenge that Remains: A Review. **Parasitology Research**, v.103, n.1, p.1-10, 2008.

SANTOS, F.L.A.; LYRA, M.A.M.; ALVES, L.D.S. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v.33, n.1, p.37-47, 2012.

SANTOS, F. N. **Imunoterapia contra a leishmaniose visceral experimental canina com a vacina Leishmune® enriquecida de saponina**/ Fernanda Nunes Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/IMPPG, 2007. xii, 181 fl II.; 31 cm. Orientadora: Clarisa B. Palatnik de Sousa. Referências Bibliográficas: F. 61-79. (Dissertação) Mestrado UFRJ/IMPPG/2007

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of Leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.21, n.6, p.307-315, 2004.

## TOXOPLASMOSE AGUDA ASSOCIADA A HEMOCULTURAS POSITIVAS PARA *Kocuria kristinae* EM PACIENTE IMUNOCOMPETENTE NO ESTADO DO AMAPÁ

Stephanie Pereira Leal<sup>1</sup>, Ellen Paola de Araújo Castro<sup>1</sup>, Rafael Darwich Coral Soares<sup>2</sup>

1. Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Aluna do Programa de Graduação em Medicina, Macapá, Amapá, Brasil;

2. Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Professor do Programa de Graduação em Medicina, Macapá, Amapá, Brasil.

### RESUMO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns no mundo, sendo, geralmente, benigna e assintomática em hospedeiros imunocompetentes. *Kocuria kristinae* é uma bactéria pertencente à família das Micrococcaceae, que contém 18 espécies, das quais 5 são patógenos oportunistas. Os poucos relatos na literatura a respeito de infecção por *Kocuria* se relacionam a pacientes imunocomprometidos. No estado do Amapá, paciente do sexo masculino, 44 anos, deu entrada no pronto-atendimento queixando-se de febre, mialgia e calafrios há três dias. Ao hemograma, observou-se discreta leucopenia, ausência de plasmódio na pesquisa pelo método gota espessa e sorologia para dengue IgM negativa e IgG positiva. Em sua terceira ida ao pronto atendimento, foi encaminhado ao infectologista que observou, ao exame físico, febre, tosse e linfonodomegalia. Retornou posteriormente com mal-estar e fadiga, e foram então realizados exames radiológicos, reação de Widal e hemoculturas com resultado positivo para a bactéria *Kocuria kristinae* e anticorpos IgM e IgG positivos para *Toxoplasma gondii*. A *K. kristinae* usualmente não é patogênica e habita a pele e a orofaringe humana sem causar dano. A infecção por esses organismos é rara, não havendo até o presente momento, nas bases virtuais, relato de outros casos no Brasil. Este relato corresponde ao de um homem sem antecedentes de imunocomprometimento e sem uso de cateteres, o qual apresentou um par de hemoculturas com resultado positivo para *K. kristinae*, denotando a singularidade desse caso em comparação a outros da literatura revisados.

**Palavras-chave:** *Kocuria kristinae*, *Kocuria* spp. and Brasil.

### ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most common zoonosis around the world, usually benign and asymptomatic in immunocompetent hosts. *Kocuria kristinae* is a bacterium belonging to Micrococcaceae family that contains 18 species, of which 5 are opportunistic pathogens. The few reports on literature about infection by *Kocuria* are related to immunocompromised patients. In Amapá a 44 years-old male patient was admitted on Emergency Room

complaining about fever, myalgia and chills for 3 days. Hemogram shows mild leukopenia, absence of plasmodium in “blood smear” test and dengue serology IgM negative and IgG positive. On his third turn to the Emergency Room, he was sent to a specialist doctor which saw at clinical exam, fever, cough and lymphadenomegaly. He came back later with malaise and fatigue, so radiological exams, Widal Test and hemocultures with positive results for *K. kristinae* and positive IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* were performed. *K. kristinae* is usually non-pathogenic and dwell the human skin and oropharynx without any damage. The infection by those organisms is rare, and there aren't until the present moment, on virtual basis, related cases on Brazil. This report corresponds to a man with no precedents of immunosuppression or use of catheters, which showed up a pair of hemocultures with positive result to *K. kristinae* denoting the singularity of this case compared to the other literature cases reviewed.

**Keywords:** *Kocuria kristinae*, *Kocuria* spp. and Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo apicomplexa. Dentro desse filo, há uma variedade de gêneros de protozoários parasitas que causam infecção tanto em seres humanos como em outros animais (KIM; WEISS, 2004). O *T. gondii* é uma das mais comuns zoonoses no mundo, afetando cerca de um terço da população mundial, no entanto é geralmente benigna e frequentemente assintomática em hospedeiros imunocompetentes. Contudo, a toxoplasmose é uma das mais importantes doenças oportunistas em imunodeprimidos, como pessoas vivendo com HIV e transplantados de órgãos. Nestes pacientes pode até evoluir com sintomas severos de encefalite, como cefaleia, febre, convulsões e confusão mental. Outra importante implicação é a primo-infecção em mulheres grávidas, em que o parasita pode cruzar a barreira placentária, podendo provocar aborto e malformações como como hidrocefalia, retinocorioidite e atraso no desenvolvimento psicomotor (SAADATNIA; GOLKAR, 2012; WOODHALL et al., 2014).

O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, que é adquirido pelo homem por diversas vias, entre elas a ingestão de carnes malcozidas contendo cistos, consumo de comida ou água contaminada com fezes de gatos infectados, transfusão de sangue ou transplante de órgãos ou infecção vertical entre mãe e filho por via transplacentária. O homem é apenas um dos hospedeiros intermediários, por ser o local do ciclo assexuado desse ser, enquanto os hospedeiros definitivos são animais da família Felidae (ex. gatos),

onde ocorre no intestino desses animais o ciclo sexuado desse protozoário (CDC, 2017; SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

*Kocuria kristinae* é uma bactéria gram-positiva anaeróbica facultativa pertencente à família das Micrococcaceae, que contém 18 espécies, das quais 5 são patógenos oportunistas. *K. kristinae* naturalmente reside de forma comensal na flora da pele humana e na cavidade oral (HASSAN et al., 2016).

Há poucos relatos reportados na literatura sobre a infecção por *Kocuria*. Entre eles, tem-se a bacteremia em pacientes imunocomprometidos que fizeram uso de cateter e aqueles com doença crônica, peritonite, colescistite, infecção do trato urinário em pacientes com cateter vesical de demora e endocardite de valva nativa.

A prevalência subestimada desse microrganismo provavelmente deve-se à identificação incorreta deste como estafilococos coagulase-negativos e ausência de diretrizes para sua avaliação clínica como patógeno de fonte comum de contaminação (HASSAN et al., 2016).

Na literatura são observáveis diferentes casos ao redor do mundo. Na Índia, um jovem de 20 anos, previamente hígido, após necessidade de uso de cateter vesical apresentou ITU causada por *Kocuria* (TEWARI et al., 2013). Uma idosa de 70 anos no Egito, devido a inserção de cânulas periféricas para aplicação de fluidos intravasculares evoluiu com fraqueza de membros inferiores e febre, a hemocultura apresentou bacteremia por *K. kristinae* (HASSAN et al., 2016). Na Espanha, paciente de 56 anos, com histórico de cirurgia de vascular três anos antes, é examinado e diagnosticado com endocardite de válvula nativa por *Kocuria kristinae*. Até então, nenhum caso foi relatado no Brasil (ROBLES-MARHUENDA et al., 2015).

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

Foram analisados artigos encontrados na base de dados do PubMed, Google Scholar e SciELO, usando como palavra-chave "*Kocuria kristinae*". Os dados do caso foram colhidos em análise de prontuário do paciente, junto aos exames realizados com sua autorização mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estima-se que 25 a 30% da população mundial seja infectada pela toxoplasmose, no entanto há grande variação de prevalência entre diferentes países, com diferença de 10 a 80% entre estes. Essa variação também é vista entre continentes, onde há baixa prevalência (10 a 30%) na América do Norte e Europa, por exemplo, e alta prevalência (>50%) na América latina e países da África tropical. Muitos fatores podem afetar a soroprevalência deste protozoário em humanos. Entre eles, têm-se fatores climáticos que afetam a sobrevivência dos oocistos, dessa forma países de clima quente e úmido predispõem a mais casos; também fatores como tipo de dieta (tipo de cozimento dos alimentos, gênero de carnes ou vegetais consumidos, forma de limpeza dos vegetais, etc.), sociais, econômicos e cobertura de saneamento e água tratada (GANGEUS; DARDÉ, 2012).

No Brasil, a taxa de infecção com o *T. gondii* é muito alta, onde a prevalência aumenta com o aumento da idade, com estimativas de 50 a 80% das mulheres em idade fértil tenham anticorpos para esse parasita e o risco de mulheres não infectadas terem a primo-infecção durante a gravidez é elevado, devido à alta contaminação do ambiente com oocistos. Já em crianças do ensino fundamental, a infecção é de aproximadamente 50%. A taxa de crianças com infecção congênita não é pequena também, onde 5 a 23 crianças nascem com toxoplasmose por 10.000 nascidos vivos no Brasil (DUBEY et al., 2012).

Como já dito, em hospedeiro imunocompetentes, a toxoplasmose adquirida é assintomática na maioria das vezes, todavia entre 10 a 20% das pessoas com infecção aguda apresentarão sintomas. Ela pode cursar com linfadenomegalia cervical com ou sem síndrome semelhante à gripe, como febre, faringite, cefaleia e mialgia. Em alguns casos também, pode haver infecção ocular que leva a perda irreversível da acuidade visual, e quando não tratada adequadamente, pode levar à cegueira (CDC, 2017).

O diagnóstico de toxoplasmose é feito através de achados de evidências que mostram: 1) a presença do protozoário (por meio da imunoperoxidase); 2) identificação do DNA do *T. gondii* em tecidos ou fluídos do hospedeiro (através da cadeia de polimerase reversa [PCR], por exemplo); 3) presença de anticorpos antiparasitários ou 4) isolamento de parasitas em tecido/fluído de ratos inoculados em laboratórios ou identificação de células em culturas de tecidos (SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

Bactérias do gênero *Kocuria* pertencem à família Micrococcaceae, à subordem Micrococccinae, à ordem Actinomycetales, à classe Actinobactéria e ao filo Actinobacteria. O gênero *Kocuria* consiste em bactérias coco gram-positivo, que são catalase-positiva e coagulase-negativa, arranjada em pares com cadeias curtas, essa morfologia não é única desse gênero, o que a torna semelhante também morfologicamente a bactérias *Staphylococcus* e a *Micrococos*, que fazem parte da mesma família. Sendo assim, a melhor forma de identificação dessas bactérias se dá por uso de métodos moleculares, e não morfológicos, já que podem levar ao não reconhecimento desse gênero e confusão com outros mais comuns. O método de amplificação por PCR e sequenciamento do gene 16S RNAr é reconhecido como forma mais eficaz de identificação de bactérias, inclusive do gênero *Kocuria* (KANDI et al., 2016).

No entanto, os laboratórios de microbiologia, que não dispõem de método molecular, e que usam apenas a reação de gram, catalase e coagulase, podem incorrer ao erro de identificação, levando erroneamente a classificação como *Staphylococcus* coagulase-negativo. Todavia, estudos anteriores mostram que na indisponibilidade de testes moleculares, é possível fazer diferenciação de *Kocuria* de *Staphylococci* e *Micrococci* através do uso de identificação morfológica, características de cultura e uso de diferenciação pelo perfil de suscetibilidade a antibióticos (KANDI et al., 2016).

O presente caso se refere a um paciente do sexo masculino, 44 anos, que deu entrada no pronto-atendimento no dia 12/02/2019 queixando-se de febre, mialgia e calafrios há 3 dias. Ao hemograma, observou-se discreta leucopenia ( $4.450/\text{mm}^3$ ), ausência de plasmódio na pesquisa pelo método gota espessa e sorologia para dengue IgM negativa e IgG positiva.

Retornou ao hospital no dia 18/02/2019 com mesma sintomatologia acrescida de cefaleia. Ao hemograma, destaca-se exame de Proteína C Reativa (PCR) acima dos valores de referência (51,1mg/L); novamente foi solicitada sorologia para dengue e pesquisa de plasmódio e seus resultados se mantiveram os mesmos.

Após 10 dias, 28/02/2019, fazendo uso de dipirona, retorna ao pronto atendimento devido a manutenção dos sintomas. Foi então encaminhado ao médico infectologista, que observou, em anamnese e exame físico, febre baixa persistente, tosse discreta, linfonodomegalia occipital, submandibular e inguinal, com nódulos fibroelásticos, móveis e indolores de aproximadamente 0,5cm. Foi solicitada sorologia para síndrome mononucleose-símile, hemoculturas e PCR.

No dia 01/03/2019, o paciente voltou ao pronto atendimento, queixando-se de mal-estar e fadiga. Desta vez foram realizados exame radiológico de tórax e de seios da face (sem alterações), pesquisa de plasmódio com resultado mantido, reação de Widal não reagente e hemoculturas com resultado positivo para o patógeno *Kocuria kristinae* nas duas amostras colhidas. Além desses, o paciente realizou, na mesma data, em outro laboratório, a coleta dos exames solicitados pelo infectologista, onde se ressaltam os anticorpos IgM e IgG positivos para *T. gondii* e hemoculturas negativas nas duas amostras.

Apresentou-se ao pronto-atendimento na data de 08/03/2019 queixando-se de mal-estar e fadiga, foi medicado com sintomáticos e liberado.

Em retorno ao médico infectologista, no dia 14/03/2019, paciente apresentou melhora dos sintomas, foi solicitado ecocardiograma a fim de investigar possível endocardite.

Até o fim da produção deste trabalho o paciente não havia realizado o ecocardiograma e apresentava-se assintomático.

## 4. CONCLUSÃO

A bactéria *K. kristinae* usualmente não é patogênica e habita a pele e a orofaringe humana sem causar dano. A infecção por esses organismos é rara, não havendo até o presente momento, nas bases virtuais, relato de outros casos no Brasil. Mesmo sendo incomum, os relatos pelo mundo implicaram a *Kocuria* em paciente imunodeprimidos ou com uso de dispositivos internos, como cateter, nos quais causou endocardite, peritonite e colescistite, dentre outros (DEVKI et al., 2015).

O presente relato de caso corresponde ao de um homem sem antecedentes de imunocomprometimento e sem presença de uso de cateteres, o qual apresentou um par de hemoculturas com resultado positivo para *Kocuria kristinae*, colhidas após sua quarta ida ao pronto atendimento.

A literatura recomenda a realização de hemocultura pareada, a fim de afastar a possibilidade de resultado positivo por contaminação, sendo a presença da positividade em duas amostras, na prática clínica, indicativo de positividade no exame e real bacteremia. Assim, são raros os casos em que a positividade em duas amostras pareadas se dá por contaminação (ARAÚJO, 2012).

Outro importante ponto a ser observado nesse caso é a realização de repetidos exames em um curto período de tempo, o que sobrecarrega o sistema de saúde, seja ele público ou privado, e gera ônus. O manejo médico tem grande relevância nessa questão, pois medidas como o preenchimento adequado de prontuário evitam a repetição de exames e otimizam a qualidade da consulta e manejo do paciente, por possibilitar a comunicação entre membros da equipe multiprofissional e a continuidade da assistência prestada ao indivíduo (CFM, 2002).

## 5. REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. R. E. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. **Jornal Infect Control**, v 1, p. 08-19, 2012.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention. Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>> acesso em 24/03/2020.

CFM. Conselho Federal de Medicina. **Resolução CFM nº 1.638/2002**. Portal médico, 2002. Disponível em: <[http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/cfm/2002/1638\\_2002.htm](http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/cfm/2002/1638_2002.htm)>, acesso em 19/04/2019.

DUBEY, J.; LAGO, E.; GENNARI, S.; SU, C.; JONES, J. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n.11, p. 1375-1424, 2012.

DUNAY, I. R.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. **Clinical microbiology reviews**, v.31, n.4, p.e57-117, 2018.

HASSAN, R.M. BASSIOUNY, D.M. MATAR, Y. Bacteremia Caused by *Kocuria kristinae* from Egypt: Are There More? A Case Report and Review of the Literature. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2016, p.e6318064, 2016.

KANDI, V.; PALANGE, P.; VAISH, R.; et al. Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. **Cureus**, v. 8, n. 8, p.e731, 2016.

KIM, K.; WEISS, M.W. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004

LAKSHMIKANTHA, M.; DEVKI, V.; YOGESH, C. Is *Kocuria kristinae* an upcoming pathogen? **Int J Curr Microbiol App Sci**, v.4, n.4, p.885-889, 2015.

MARHUENDA, A. R.; et al. Native valve endocarditis caused by *Kocuria kristinae*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.34, n.7, p.464-465, 2016.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v.25, n.2, p.264-296, 2012

TWEARI, R.; et al. *Kocuria kristinae* in catheter associated urinary tract infection: a case report. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v.7, n.8, p.1692-1693, 2013.

WOODHALL, D; JONES J. L.; CANTEY, P. T.; WILKINS, P. P.; MONTGOMERY, S. P. Neglected Parasitic Infections: What Every Family Physician Needs to Know. **American Family Physician**, v.89, n.10, p.803-811, 2014

## TOXOPLASMOSE CONGÊNITA: ATUAÇÃO MÉDICA E FISIOTERAPÊUTICA NO MANEJO CLÍNICO DE UM RECÉM-NASCIDO PREMATURO NA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL

Danilo Jun Kadosaki<sup>1</sup>, Gabrielli Andreza Gomes Carrera<sup>1</sup>, Elivelton Da Costa Fonseca<sup>1</sup>, André Luiz Nunes Da Silva Carlos<sup>1</sup>, José Lucas Dias De Souza<sup>2</sup>, Andrea Bayma Pinheiro<sup>3</sup>, André Gustavo Moura Guimarães<sup>1</sup>

1. Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil;
2. Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA), Belém, Pará, Brasil;
3. Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Belém, Pará, Brasil.

### RESUMO

A Toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário que pode ter diversos meios de transmissão, sendo um deles a via transplacentária. Essa doença nos Recém-nascidos pode ser sintomática ou assintomática, sendo que nesses últimos há uma chance de 30-70% de desenvolverem sequelas futuras. Tanto de forma precoce e tardias, os achados mais comuns são: alterações no fundo de olho e no sistema nervoso central. As informações do relato de caso foram adquiridas por meio dos prontuários Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. O relato de caso é referente a uma RN pré-termo, sexo feminino e com 895g, a qual foi admitida na UTI com síndrome do desconforto respiratório e posteriormente foi diagnosticada com Toxoplasmose congênita por meio do quadro clínico sugestivo para a doença e pelos exames sorológicos. A Radiografia do tórax e mostrou uma Broncodisplasia Pulmonar (BDP); Ultrassonografia Transfontanela com Hemorragia Intracraniana grau I; Ecocardiódoppler apresentou Persistência do Canal Arterial (PCA) com importante repercussão hemodinâmica; Fundoscopia sem alterações e a Tomografia Computadorizada de crânio e a coleta do LCR não foram realizadas devido a RN se encontrar instável clinicamente. A RN ficou em Ventilação Mecânica Invasiva (VMI) e posteriormente apresentou boa evolução, ficando em O2 suplementar. Diante de diversos fatores que podem ocorrer aos recém-nascidos, torna-se fundamental que essas crianças sejam avaliadas por uma equipe multiprofissional, principalmente no que tange ao estudo, pois é referente a uma RN pré-termo, extremo baixo peso, com diagnóstico de toxoplasmose congênita e com comorbidades.

**Palavra-chave:** Toxoplasmose congênita, Multiprofissional e Prematuro.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by a protozoan that can have several means of transmission, one of which is through the transplacental. This disease in newborns can be symptomatic or asymptomatic, and in recent times, there is a 30-70% chance of developing future sequences. Both early and late, the most common findings are: changes in the fundus and in the central nervous system. The case information was acquired through the records of the Neonatal Intensive Care Unit (ICU) of the Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. The case related to a preterm, female, 895g, who was admitted to the ICU with respiratory distress syndrome and was later diagnosed with congenital toxoplasmosis through the clinical picture suggestive of the disease and serological tests. Chest X-ray and showed pulmonary bronchodysplasia (BDP); Transfontanelle ultrasonography with grade I intracranial hemorrhage; Echocardiodoppler showed Arterial Canal Persistence (PCA) with important hemodynamic repercussions; Unchanged fundoscopy and CT scan of the skull and CSF collection were not caused due to newborns being clinically unstable. One RN was on Invasive Mechanical Ventilation (IMV) and subsequently showed good progress, staying on supplemental O2. In view of several factors that can occur in newborns, it is essential that these children are evaluated by a multidisciplinary team, especially with regard to the study, as it refers to a preterm newborn, lower weight, diagnosed with congenital toxoplasmosis and comorbidities.

**Keywords:** Congenital toxoplasmosis, multidisciplinar and Premature.

## 1. INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário da espécie *Toxoplasma gondii*, sendo possível ocorrer a transmissão por diversos meios, como a via transplacentária, ou seja, doença da mãe para o feto, sendo denominada de Toxoplasmose Congênita (VIEIRA; DALLA, 2018). Ademais, no que tange aos aspectos epidemiológicos da Toxoplasmose Congênita, a incidência e a prevalência da doença segundo o Ministério de Saúde tem uma grande variabilidade de acordo com o Estado brasileiro, como em Goiás foi registrado uma prevalência de 1 a cada 100 partos, enquanto no Rio Grande do Sul uma incidência de 8 para 10.000 nascidos vivos (BRASIL, 2018)

Um fato que se encontra intimamente interligado a essa doença congênita é a falta de conhecimento por parte das gestantes, uma vez que segundo a pesquisa de Moura et al, 2018 com gestantes acerca do conhecimento da doença, 55% de mulheres grávidas relataram não conhecerem ou nunca ouvirem nada relacionado a doença, assim como uma parcela significativa das entrevistadas desconhecem as possíveis formas transmissão.

Dentro desse contexto de fatores maternos, o número de consultas pré-natais e o período em que foram iniciadas as consultas se encontram associados as taxas de transmissão da doença, uma vez que gestantes que iniciam o pré-natal no primeiro

trimestre e realizam 6 ou mais consultas apresentam baixas chances de transmissão por via placentária da toxoplasmose congênita (SILVA et al., 2019)

Associado a isso, o diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito de forma precoce nas gestantes por meio da pesquisa de anticorpos específicos, como a imunoglobulina G e a imunoglobulina M, os quais são preconizados pelo Ministério da Saúde para serem realizados durante o primeiro e terceiro trimestre do pré-natal (TABILES et al., 2015). Dentro desse contexto, nos casos de gestantes que não realizaram o pré-natal adequado se tornam mais propensas a terem um filho com toxoplasmose congênita, caso estejam infectadas na fase aguda, os quais serão submetidos a exames sorológicos para confirmar a doença. (TABILES et al., 2015).

Uma parcela significativa das crianças com a doença é assintomática, contudo alguns sintomas inespecíficos podem surgir, sendo necessária uma intervenção, se a doença não for tratada, pois a criança poderá apresentar sequelas no futuro (SILVA; SANTOS; LOBO, 2018). Nesse cenário, em torno de 30% a 70% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita assintomáticos terão uma seqüela futura, como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, lesões oculares e no sistema nervoso central (GONÇALVES, 2018). Os principais meios de identificar o diagnóstico em crianças assintomáticas infectadas pela doença são por meio do fundo de olho alterado, sorologias e alterações no ultrassom transfontanela (ALMEIDA, 2017)

No que tange as sequelas oculares, torna-se imperioso ser investigado em todo caso de toxoplasmose congênita com o objetivo de instituir o tratamento adequado e de forma precoce para evitar problemas visuais (ANDRADE et al., 2018). Ademais, uma avaliação do cérebro por intermédio de um exame de imagem, como a tomografia computadorizada de crânio, é de suma importância para avaliar os danos cerebrais que podem ocorrer, a exemplo das principais sequelas e achados que são as calcificações e dilatações ventriculares (MALAMED, DORNELLES; ECKERT, 2001). Além disso, as crianças apresentam riscos elevados de nascerem prematuras e com baixo peso, tais situações intensificam um péssimo prognóstico (BISCHOFF et al., 2015).

Visto isso, as sequelas da Toxoplasmose Congênita podem prejudicar a evolução de um quadro clínico com bom prognóstico da doença. Dentro desse contexto, torna-se fundamental que a avaliação clínica de um RN com Toxoplasmose Congênita seja feita por meio de uma equipe multiprofissional com o intuito de realizar planos terapêuticos e, posteriormente, gerar um melhor prognóstico e boa qualidade de vida.

## 2. MATERIAIS E MÉTODO

Trata-se de um estudo descritivo e observacional, sendo feito um Relato de Caso que foi realizado na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará no ano de 2019. O seguinte caso foi admitido na instituição, cujo Recém-nascido (RN) com Toxoplasmose Congênita. Diante disso, foi feita uma análise de prontuário referente aos dias em que o RN ficou internado no Hospital. As informações coletadas são da equipe multiprofissional composta por médicos e fisioterapêuticas de diversas especialidades, onde foram adquiridos dados acerca do quadro clínico do paciente, exames laboratoriais e de imagens realizados, tratamento estimulado e parâmetros ventilatórios.

## 3. RELATO DE CASO

Admitida no hospital materno-infantil de referência neonatal, Recém-nascido (RN) pré-termo de 30 semanas; sexo feminino; 895g; ao nascer apresentou apneia, cianose e icterícia; APGAR 8/9; foi direcionada a UTI Neonatal com o diagnóstico de Síndrome do Desconforto Respiratório, aliado a Toxoplasmose congênita. No exame físico a RN apresentou crepitações na ausculta respiratória, na ausculta cardíaca sopro sistólico 3+/6+ e abdome flácido com fígado 2,5cm RCD.

Nos exames laboratoriais: leucócitos de 48.000/mm<sup>3</sup>; PCR 9,45. Com o intuito de tratar a infecção do RN, foram administradas ampicilina por 10 dias, depois trocada por Amicacina e metronidazol por 8 dias, e por fim, a utilização de oxacilina por 7 dias. Sorologia para toxoplasmose realizado depois de 1 mês de internação: IGG reagente (>200) e IgM não reator; Mãe realizou sorologia para Toxoplasmose e foi confirmado IgM reagente, sendo que não tratou durante a gestação. Visto isso, foi suspenso a utilização dos antibióticos citados anteriormente e se iniciou o tratamento com o esquema para toxoplasmose (Pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico).

O RN realizou Radiografia do tórax e mostrou uma Broncodisplasia Pulmonar (BDP); Ultrassonografia Transfontanela com Hemorragia Intracraniana grau I; Ecocardi Doppler apresentou Persistência do Canal Arterial (PCA) com importante repercussão

hemodinâmica; Fundoscopia sem alterações e a Tomografia Computadorizada de crânio e a coleta do LCR não foram realizadas devido a RN se encontrar instável clinicamente.

Além disso, a RN foi colocada em Ventilação Mecânica Invasiva (VMI) no modo SIMV/TCPL + PS, com o objetivo de manter as vias aéreas pérvias e, estabilizando seu quadro clínico, a RN necessitou de intubação durante 1 mês, evoluindo com parâmetros como: PINSP com máxima de 20 cmH<sub>2</sub>O e mínima de 15 cmH<sub>2</sub>O e a PSV tendo como máxima 12 e a mínima de 10, mostrando que o RN conseguiu evoluir bem para o desmame do ventilador, e posteriormente no 46º dia de internação foi para o O<sub>2</sub> suplementar, adquirindo um bom prognóstico. Ademais, a RN recebe manobras de higiene brônquicas a fim de manter as vias aéreas pérvias.

#### 4. CONCLUSÃO

Trata-se de um caso de Toxoplasmose Congênita associada de BDP, PCA e prematuridade. A ventilação mecânica por um período prolongado desencadeou duas consequências no RN: retardo dos exames complementares, como a TC, devido à ausência do ventilador portátil para realizar o exame, e o agravamento da BDP, o que pode acarretar distúrbios respiratórios com o passar dos anos. A higiene brônquica realizada pela Fisioterapia é essencial para manter as vias aéreas pérvias, contribuindo para diminuição de tempo da VMI. É fundamental o acompanhamento sorológico na gestação para evitar possíveis casos de Toxoplasmose Congênita. Deve-se realizar um monitoramento além do período neonatal devido as possíveis sequelas que podem surgir tardiamente, como coriorretinite e atraso no desenvolvimento.

#### 5. REFERÊNCIA

ALMEIDA, M.I.B. **Associação das manifestações da toxoplasmose congênita em recém-nascidos e lactentes com a história gestacional e tratamento materno.** (Dissertação) Mestrado em Ciências - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

ANDRADE, J.V.; et al. Newborns at risk for congenital toxoplasmosis, review of 16 years. **Scientia Medica**, v.28, n.4, p.1-11, 2018.

BISCHOFF, A.R.; et al. Incidence of congenital toxoplasmosis over a 10-year period at a university hospital and frequency of symptoms in this population. **Boletim Científico de Pediatria**, v.4, n.2, p.38-44, 2015.

BRASIL. **Protocolo de notificação e investigação: Toxoplasmose gestacional e congênita**. 1ª edição, Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2018

GONÇALVES, F.T.O. **Desafios E Perspectivas Da Toxoplasmose Gestacional E Congênita: Uma Revisão Da Literatura**. (Monografia) Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2018.

MELAMED, J.; DORNELLES, F.; ECKERT, G.U. Cerebral CT scan alterations in children with ocular lesions caused by congenital toxoplasmosis. **Jornal de Pediatria**, v.77, n.6. p.475-480, 2001

SILVA, B.C.T.; et al. Congenital Toxoplasmosis: Control Strategies During Prenatal Care. **Revista Caderno de Medicina**, v.2, n.1. p.16-26. 2019.

SILVA, C.O.; SANTOS, C.L.; LOBO, M.R.G. Sequelas Da Toxoplasmose Congênita Durante A Gestação: Revisão Integrativa Da Literatura. **Anais dos CONCIFA**, 2018.

TABILE. P.M.; et al. Toxoplasmose Gestacional: uma revisão da literatura. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v.5, n.3, p.1-5, 2015.

VIEIRA, M.C.; ROSA, L.D. A Crescente Incidência Da Toxoplasmose Congênita. **XXIII Seminário interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão**, 2018.

MOURA, D.S.; OLIVEIRA, R.C.M.; ROCHA, T.J.M. Toxoplasmosis in pregnancy: Epidemiological profile and knowledge of pregnant women assisted in basic units of an Alagoan municipality. **Arquivos médicos**, v.63, n.2, p.69-76. 2018.

## TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE: FÁRMACOS ATUAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Erica dos Santos Martins-Duarte<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### RESUMO

A Toxoplasmose é uma doença de ampla distribuição mundial e ocasionada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A toxoplasmose pode ocasionar diferentes manifestações clínicas e é de grande relevância em diferentes áreas médicas, tais como pediatria, ginecologia e obstetrícia, infectologia e oftalmologia. Embora sua importância médica, o tratamento atual da toxoplasmose está restrito a poucas alternativas terapêuticas e que estão relacionadas a efeitos colaterais diversos. Outro problema relacionado ao tratamento vigente é que todos os fármacos utilizados somente atuam na fase aguda da doença, ou seja, são ineficazes na fase crônica da doença e não levam a cura parasitológica do paciente. Além disso, há indícios crescentes de resistência ao tratamento e assim, a busca por novos tratamentos é de extrema importância. Neste capítulo será apresentado uma revisão sobre os tratamentos vigentes da toxoplasmose, abordando seus mecanismos de ação, problemática e possível resistência. Além disso, também serão abordados trabalhos recentes na área com perspectivas para futuros tratamentos.

**Palavras-chave:** Sulfadiazina-pirimetamina, Apicoplasto e Resistência.

### ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease with wide distribution worldwide and caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. The disease is related to different clinical manifestations and is of great relevance in different medical areas, such as pediatrics, gynecology and obstetrics, infectious diseases and ophthalmology. Despite its medical importance, the current treatment of toxoplasmosis is restricted to few therapeutic alternatives that are related to different side effects. Another problem related to the current treatment is that all drugs used only act in the acute phase of the disease, that is, they are ineffective in the chronic phase of the disease and do not lead to the patient's parasitological cure. In addition, there is growing evidence of resistance to treatment. Therefore, the search for new treatments is extremely important. In this chapter, a review of current toxoplasmosis treatments will be presented, addressing their mechanisms of action, problems and possible resistance. In addition, recent work in the area with perspectives for future treatments will also be addressed.

**Keywords:** Sulfadiazine-pyrimethamine, Apicoplast and Resistance

## 1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* somente ganhou importância médica vinte e nove anos após sua primeira descrição em 1908, por Nicolle e Manceaux na Tunísia e também por Splendore no Brasil (NICOLLE; MANCEAUX, 1908) (SPLENDORE, 1908). Em 1937, Wolf e Cowen identificaram o *T. gondii* como a causa da morte de uma criança recém-nascida por encefalite nos Estados Unidos (WOLF; COHEN; PAIGE, 1937). Desde então os relatos de toxoplasmose humana aumentaram (GUIMARAES, 1943), por exemplo, não tardou para que outra forma clínica comum da doença, a toxoplasmose ocular, fosse reportada (WILDER, 1952).

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) pelo vírus HIV no início dos anos 80 o *T. gondii* voltou a ganhar grande atenção médica, pois é um dos patógenos oportunistas mais comuns associadas a esta doença (LUFT et al., 1984). Antes da introdução da terapia antirretroviral de alta eficácia, a encefalite pelo *T. gondii* era causa comum de mortalidade e morbidade, em maioria devido a reativação da doença crônica no sistema nervoso central. O *T. gondii* ainda hoje é um dos patógenos oportunistas mais comuns em pacientes com HIV (COELHO et al., 2014).

No início deste século, a toxoplasmose ocular, antes acreditada estar associada somente a infecção congênita, foi reconhecida como causa comum de retinocoroidite em indivíduos com infecção recém-adquirida, independente da condição imune (ARANTES et al., 2015). Além disso, evidências crescentes sugerem a infecção crônica pelo *T. gondii* relacionada a diversos distúrbios neurológicos, como esquizofrenia e depressão (FLEGR; HORÁČEK, 2020).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A DESCOBERTA INICIAL DE UM TRATAMENTO PARA A TOXOPLASMOSE

A busca por tratamentos para a Toxoplasmose teve início logo após a identificação do *T. gondii* como um patógeno humano. Como primeira estratégia foi avaliada a atividade anti-*T. gondii* de diversos antibióticos, antifúngicos e anti-maláricos já em uso na clínica em humanos. Dentre os fármacos testados estavam: cloramfenicol, penicilina, estreptomicina,

neomicina, fumagalina e auromicina. Nenhum destes apresentou efeitos satisfatórios em animais de laboratório infectados com *T. gondii*. A única exceção foi a auromicina, que foi ineficaz em humanos (EYLES, 1953).

Resultados promissores a uma futura terapia da toxoplasmose surgiram a partir dos estudos com as sulfonamidas: sulfanilamida, sulfopiridina e sulfatiazole, primeiramente avaliadas em 1942 em estudos independentes por Sabin e Warren nos Estados Unidos e Biocca e Pasqualin no Brasil. Logo depois, o efeito da sulfadiazina (SDZ) foi estudado por Weinman e Berne em 1944 e por Biocca e Nobrega em 1946, e comparada a outras sulfonamidas, a SDZ mostrou ser mais ativa em camundongos infectados. No entanto, o uso clínico de SDZ como monoterapia não mostrou bons resultados em humanos (EYLES, 1953).

O tratamento efetivo para a toxoplasmose começou a ser traçado a partir do estudo da atividade de uma série de 2,4-diaminopirimidinas com atividade anti-malárica, desenvolvida pelo laboratório *Wellcome Research* (FALCO et al., 1951). Dentre o grupo de 2,4-diaminopirimidinas avaliadas, a pirimetamina (PIR) foi a mais eficaz no controle da infecção pelo *T. gondii* em camundongos (EYLES; COLEMAN, 1952). Motivado por resultados prévios em malária, o efeito combinado de PIR (comercializado como Daraprim®) com SDZ foi estudado, obtendo-se um efeito sinérgico: a adição de SDZ potencializou em 8 vezes o efeito da PIR em camundongos infectados (EYLES; COLEMAN, 1953). E desde 1958, quando foi aprovado o uso da PIR em humanos nos Estados Unidos, a combinação de PIR e SDZ é usada como primeira escolha para o tratamento da toxoplasmose.

## 2.2. FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE

### 2.2.1 Fármacos que atuam no metabolismo do Ácido Fólico

O metabolismo do ácido fólico é o alvo dos fármacos usados como primeira escolha para o tratamento da toxoplasmose. Por ser um análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzóico (PABA), a SDZ, assim como outras sulfonamidas, inibem de forma competitiva a síntese do ácido fólico (dihidrofolato), a partir do PABA e da pteridina, pela enzima dihidropteroato sintetase (DHPS). Já a PIR, por mimetizar uma região da pteridina no ácido fólico, inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), que é a etapa seguinte da via e responsável por sintetizar o tetrahidrofolato (ácido folínico) (VAN BAMBEKE et al., 2017).

SDZ e PIR por atuarem em enzimas sequenciais de uma mesma via, bloqueando a síntese do ácido fólico e folínico, respectivamente, atuam de forma sinérgica (HITCHINGS, 1952). O efeito sinérgico anti-*T. gondii* ficou evidente em estudo *in vitro* no qual foi observado que os tratamentos com concentrações individuais de 0,1 µg/ml de PIR ou 25 µg/ml de SDZ inibiu a proliferação de taquizoítos em 10% ou não teve qualquer efeito, respectivamente. Já a combinação de ambos fármacos nestas mesmas concentrações inibiu em 100% a proliferação de *T. gondii* (HARRIS et al., 1988).

Enquanto o parasito é capaz de sintetizar seu próprio ácido fólico, humanos não possuem a enzima DHPS e adquirem o ácido fólico da dieta. Já a DHFR está presente tanto em *T. gondii* quanto nas células de mamíferos, e embora PIR possua uma seletividade de 8-12 vezes para a DHFR de *T. gondii* em relação a DHFR de humanos (HOPPER et al., 2019), a dose administrada na clínica é suficiente para ocasionar uma inibição residual na enzima no mamífero. Assim, de forma a reduzir os efeitos colaterais causados por este fármaco, o ácido folínico (leucovorin) é administrado juntamente com a PIR.

O uso de SDZ e PIR, juntamente com o leucovorin, é a terapia de escolha para todas as formas de toxoplasmose aguda sintomática e também como tratamento de gestantes em fase aguda a partir da 16<sup>o</sup> semana de gestação. Devido sua importância, PIR e SDZ compõem a Relação Nacional de Medicamentos de Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica e são distribuídos aos Estados e Municípios pelo Ministério da Saúde desde 2018 (Anexo II da RENAME 2017).

Além da combinação de SDZ e PIR, também é utilizado na clínica a combinação de trimetoprim e sulfametoxazol (TMP-SMX) (Bactrim ®), que tal qual a combinação de primeira escolha, inibem a DHPS e DHFR, respectivamente. O uso da combinação de TMP-SMX é empregado como terapia preventiva a reativação da toxoplasmose e pneumonia causada por *Pneumocitis carinii* em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com AIDS. Além disso, também tem mostrado eficácia no tratamento da encefalite e retinocoroidite por *T. gondii*. Portanto, pode ser uma alternativa em países onde não se encontram disponíveis SDZ e PIR (TORRE et al., 1998) (ZHANG; LIN; LU, 2018). Outras vantagens da combinação de TMP-SMX é que não necessita a inclusão do leucovorin ao tratamento, está disponível em formulação única combinada e também pode ser administrada por via endovenosa.

Outro antagonista da síntese do ácido fólico com efeito na terapia da toxoplasmose é a dapsona, uma sulfona que inibe a DHPS tal como as sulfonamidas antimicrobianas. Pode ser usada em pacientes intolerantes a sulfas juntamente com a PIR e leucovorin na prevenção da reativação da toxoplasmose em pacientes imunossuprimidos. No entanto, a

dapsona costuma ser pouco empregada devido a sua alta toxicidade (CONTOPOULOS-IOANNIDIS; MONTOYA, 2018).

A PIR, sem dúvida, é o fármaco principal e mais eficaz no tratamento da toxoplasmose e o sucesso da inibição da DHFR para o tratamento desta doença baseia-se em vários fatores: (1) *T. gondii* é incapaz de obter folato reduzido (ácido folínico) de forma exógena, dependendo exclusivamente de sua síntese (ALLEGRA et al., 1987), ao contrário do ácido fólico (MASSIMINE et al., 2005); (2) A enzima DHFR possui papel vital na manutenção de moléculas de tetrahidrofolato; (3) O tetrahidrofolato é importante para a síntese de glicina a partir da transferência de uma metila do aminoácido serina ao tetrahidrofolato; (4) O tetrahidrofolato metilado atua como doador de metila para a síntese de nucleotídeos de desoxitimidina monofosfato pela enzima Timidilato Sintase (TS) (RUSTUM, 2004); (5) Em *T. gondii* a DHFR e a TS residem em um polipeptídeo bifuncional, já em humanos as atividades da TS e DHFR residem em enzimas separadas (ANDERSON et al., 2017); (6) *T. gondii* é incapaz de obter timidina de forma exógena a partir da célula hospedeira, e assim depende de sua via biossintética *de novo* a partir da TS (SCHWARTZMAN; PFEFFERKORN, 1981). Logo a inibição da DHFR leva a depleção de folatos reduzidos, o que conseqüentemente causa uma inibição indireta na síntese de ácidos nucleicos e síntese de proteínas, inibindo então a proliferação parasitária.

Devido aos motivos listados acima, a DHFR continua sendo fonte de estudos na busca de novos inibidores ativos ao *T. gondii*. Nestes estudos buscam-se por compostos que sejam ainda mais seletivos a enzima DHFR de *T. gondii* em relação a de humanos e que inibam o *T. gondii* em concentrações ainda menores do que a PIR, o que reduziria o potencial tóxico ao hospedeiro e poderia excluir a necessidade do uso da SDZ. O anel 2,4-diamino pirimidina possui uma potente atividade inibitória da DHFR, de forma que diversos análogos contendo este anel são exaustivamente estudados por vários grupos na busca de novos compostos mais potentes e seletivos ao *T. gondii*. Estudo recente desenvolvido por Hopper et al. (2019) reportou que um inibidor da DHFR baseado em metoxipirimidina inibiu a DHFR de *T. gondii* com IC<sub>50</sub> na faixa de nanomolar e com uma seletividade 196 vezes maior em relação a enzima de humanos. Estudos *in vivo* em modelos de infecção aguda mostraram que o tratamento dos animais com o novo composto na dose de 1 mg/kg resultou em uma sobrevivência semelhante ao tratamento com 18 mg/kg de PIR (HOOPER et al., 2019).

### 2.2.2. Antibióticos inibidores da síntese de proteínas em procariotos

Antibióticos lincosamidas e macrolídeos são conhecidos inibidores da síntese proteica em procariotos e amplamente utilizados na clínica para o tratamento de infecções bacterianas. Em *T. gondii* estes antibióticos exercem o efeito na síntese proteica da organela de origem procariota apicoplasto (BECKERS et al., 1995), que é um sítio de importantes vias metabólicas para o parasito.

O efeito anti-*T. gondii* dos macrolídeos foi primeiramente reportado por Bogacz em 1954, em um estudo no qual identificou a espiramicina (SPI) como um agente anti-*T. gondii* (BOGACZ, 1954). Por não atravessar a placenta e não exercer efeito teratogênico a SPI é o tratamento de escolha, e é amplamente utilizado, na prevenção da transmissão congênita em mulheres grávidas em primo-infecção pelo *T. gondii* durante as primeiras semanas de gestação (BOURGET et al., 1996). A SPI também faz parte da Relação de Nacional de Medicamentos de Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica. Outros macrolídeos com efeitos reportados em *T. gondii* são claritromicina e azitromicina (AZT), no entanto somente a segunda é amplamente utilizada como segunda opção ao tratamento da toxoplasmose. O tratamento com AZT pode ser administrado como monoterapia ou em combinação com a PIR para o tratamento de encefalite e retinocoroidite (BONFIOLI; OREFICE, 2005) (JACOBSON et al., 2001).

Em relação as lincosaminas, o efeito anti-*T. gondii* da clindamicina (CLN) foi primeiramente reportado no início de 1970 (ARAUJO; REMINGTON, 1974) e tornou-se logo uma segunda opção ao tratamento da retinocoroidite por *T. gondii* (TABBARA; O'CONNOR, 1980). Com o surgimento do HIV e os problemas de alta toxicidade a sulfa nestes pacientes, a CLN tornou-se a segunda escolha ao tratamento juntamente com a PIR. Estudos clínicos demonstraram que a combinação de CLN e PIR possui eficácia comparável a combinação de SDZ-PIR, e ainda hoje a CLN é recomendada como segunda alternativa ao tratamento da toxoplasmose (KATLAMA et al., 1996). O uso de CLN e dexametasona intravítrea tem sido empregado em pacientes com toxoplasmose ocular como forma de reduzir os efeitos adversos devido a administração sistêmica (ZAMORA et al., 2015).

O uso de CLN ou AZT na terapia da encefalite pelo *T. gondii* somente é recomendada em pacientes que não toleram o tratamento com SDZ. Estudos clínicos mostram que pacientes tratados com CLN ou AZT associada a PIR mostram maior taxa de relapsos do que os tratados com a combinação com SDZ (KATLAMA et al., 1996) (JACOBSON et al.,

2001). O efeito clínico da CLN combinada a PIR é mais conhecido do que o da AZT e, por isso, deve ser a segunda escolha em substituição a SDZ (DUNAY et al., 2018).

### 2.2.3 Atovaquona

O último fármaco introduzido ao tratamento da toxoplasmose foi a atovaquona (ATV), molécula pertencente a classe das naftoquinonas, que novamente foi desenvolvida pelo Laboratório Wellcome Research para o tratamento da malária (GUTTERIDGE, 1987). Seu efeito anti-*T. gondii* foi reportado simultaneamente por Araujo et al. (1991) e Hudson et al. (1991) (ARAUJO; HUSKINSON; REMINGTON, 1991) (HUDSON et al., 1991). A ATV possui como alvo a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial do parasito. Mais especificamente o mecanismo de ação envolve a inibição do complexo da citocromo *bc1* (complexo III), localizado na membrana mitocondrial interna (KESSL et al., 2003).

A ATV pode ser usada como terapia substitutiva aos regimes de SDZ-PIR ou CLN-PIR em pacientes intolerantes ou refratários a ambos tratamentos. Estudos clínicos com a ATV em pacientes com episódios de encefalite ou retinocoroidite por toxoplasma mostraram que a monoterapia com este fármaco é bem tolerada e com resultados satisfatórios (PEARSON et al., 1999). ATV também possui efeito em *P. carinii*, podendo ser usada em pacientes imunossuprimidos intolerantes ao regime preventivo com TMP-SMX (HUGHES et al., 1993). Uma desvantagem em relação a ATV é o seu custo mais elevado comparado aos outros fármacos e, além disso, a ATV não se encontra disponível no Brasil.

## 2.3. PROBLEMÁTICA DOS TRATAMENTOS VIGENTES

Além de estar restrito a poucos fármacos afetivos, a terapia da toxoplasmose está relacionada a diversos efeitos colaterais que comprometem a continuidade do tratamento e conseqüentemente recuperação do paciente. Dentre os componentes mais tóxicos está a SDZ, um dos fármacos de primeira escolha para a toxoplasmose. Embora humanos não possuam a enzima alvo da SDZ, cerca de 3-8% da população apresentam alergia a este fármaco, ou a qualquer outra sulfonamida (GILES et al., 2019), e não podem ser tratados com este medicamento. Além disso, está comumente relacionada a distúrbios gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia levando a interrupção do tratamento pelos pacientes. Outros efeitos mais graves, como problemas renais e pedras nos rins também são reportados. Efeitos hematológicos relacionados a supressão da medula óssea

também estão associados a combinação com PIR, mas são minimizados pela administração de leucovorin. Em pacientes com AIDS o abandono ao tratamento com SDZ-PIR pode alcançar cerca de 30% (KATLAMA et al., 1996).

Em relação a combinação de PIR e CLN a taxa de pacientes com efeitos adversos é similar ao tratamento com SDZ e PIR. Os efeitos mais comuns são reações gastrointestinais como náusea e diarreia (KATLAMA et al., 1996). Distúrbios gastrointestinais também estão relacionados ao uso de AZT e ATV. Por ocasionarem reações menos severas, o uso de CLN, ATV e AZT causam menos abandonos do que o tratamento com SDZ (IACCHERI et al., 2008).

Outra limitação grave relacionada a terapia da toxoplasmose é que fármacos antifolatos, como a PIR, são potencialmente teratogênicos e não podem ser administrados no primeiro trimestre de gestação. Durante esta fase faz-se o uso de SPI, que não atravessa a placenta e portanto somente previne a transmissão vertical mas é ineficaz caso já tenha ocorrido a transmissão congênita. Além disso, o tratamento da toxoplasmose não leva a cura parasitológica. Os fármacos vigentes atuam somente nos estágios responsáveis pela fase aguda da doença (formas taquizoítas) e não erradicam as formas responsáveis pela fase crônica da doença (bradizoítas encistados), que permanecem como fator de risco nos pacientes infectados por toda sua vida.

### 2.3.1 Resistência ao tratamento

Embora casos de pacientes refratários ao tratamento sejam comumente reportados, a relação com a aquisição de resistência de *T. gondii* aos fármacos ainda é pouco conhecida e reportada. Cepas resistentes aos fármacos vigentes já foram obtidas em laboratório a partir da pressão *in vitro* ao tratamento (PFEFFERKORN; BOROTZ; NOTHNAGEL; 1992) (PFEFFERKORN; NOTHNAGEL; BOROTZ; 1994) (REYNALDS; OH; ROSS; 2001), no entanto o mesmo não se sabe em relação às cepas submetidas ao tratamento na clínica. Análise do sequenciamento do gene da DHPS em 32 isolados humanos mostrou que somente 1 isolado apresentava polimorfismo já previamente reportado como associado a resistência a sulfas em *P. falciparum* e *P. carinii* (ASPINALL et al., 2002). Uma menor responsividade ao tratamento com SDZ, possivelmente associada a mutação no gene da DHPS, também foi reportada para isolados brasileiros congênitos (SILVA et al., 2019). No entanto, em todos os estudos não houve exposição dos pacientes ao tratamento antes do isolamento das cepas resistentes e, assim, não há como saber se

as mutações ocorreram de forma natural ou se devido ao uso de sulfas em animais de corte, como por exemplo os suínos.

## 2.4. PERSPECTIVAS FUTURAS NA TERAPIA DA TOXOPLASMOSE

A alta toxicidade dos fármacos vigentes, assim como a ineficácia dos mesmos em erradicar ou reduzir a infecção crônica, tornam a busca de novas moléculas ativas anti-*T. gondii* de grande importância. A seguir será exposto alvos e estratégias que vêm apresentando resultados promissores na busca de futuros tratamentos para a toxoplasmose.

### 2.4.1 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento baseia-se em buscar um novo uso para fármacos já disponíveis no mercado ou em fase de desenvolvimento. Esta foi a estratégia primordial na descoberta da terapia para a toxoplasmose, pois todos os tratamentos vigentes são oriundos de fármacos desenvolvidos para outros patógenos. Por já estarem em uso no mercado ou em fase de desenvolvimento, o processo de descoberta para o tratamento de uma nova doença é menos custoso e requer menos tempo para sua liberação, pois grande parte dos investimentos e testes já foram realizados. Por exemplo, a toxicidade e farmacocinética em humanos já são conhecidas (BANNO et al., 2015).

Utilizando o reposicionamento, diversos grupos de pesquisa têm demonstrado a atividade anti-*T. gondii* *in vitro* e *in vivo* de diferentes classes de fármacos, como os antifúngicos azóis (MARTINS-DUARTE et al., 2010; 2013), bisfosfonatos (usado em distúrbios ósseos) (LI et al., 2017), spiroindolona (antimalárico em pesquisa clínica) (ZHOU et al., 2014) e o anticoccídeo diclazuril (OZ, 2014).

### 2.4.2 Alvos promissores

Embora a estratégia do reposicionamento tenha a vantagem de custo reduzido, principalmente quando lidamos com uma doença de pouco interesse de indústrias farmacêuticas, perde-se, no entanto, a possibilidade de desenvolver algo efetivamente direcionado ao parasito. O sequenciamento genético e o desenvolvimento de ferramentas moleculares propiciaram a descoberta, caracterização e validação de alvos promissores em

*T. gondii*, incluindo proteínas únicas ao parasito e sem homólogos no hospedeiro humano. A seguir serão apresentadas algumas vias e enzimas promissoras na busca por tratamentos seletivos ao *T. gondii*.

#### 2.4.2.1 Vias do apicoplasto

O apicoplasto é um plastídio não-fotossintetizante adquirido a partir de uma endossimbiose secundária envolvendo o englobamento de uma alga vermelha pelo ancestral Apicomplexa, filo ao qual pertence o protozoário *T. gondii* (JANOUSKOVEC et al., 2010). A descoberta desta organela nos anos 90 (WILSON et al., 1996) seguida de evidências de seu papel essencial na sobrevivência de *T. gondii* trouxeram novas perspectivas na busca de novos tratamentos para a toxoplasmose. Por ter como origem uma cianobactéria, o apicoplasto hospeda diversas proteínas e vias metabólicas semelhantes àquelas encontradas em procariotos e plantas, e as quais não há homólogos em humanos, o que possibilita o desenvolvimento de compostos seletivos ao protozoário, e potencialmente com baixa toxicidade ao hospedeiro (VAN DOOREN; STRIEPEN, 2013)

Dentre os alvos promissores e validados no apicoplasto estão as proteínas envolvidas na replicação, transdução e tradução do seu genoma. Vale lembrar que a tradução de proteínas no apicoplasto é o alvo dos antibióticos SPI, AZT e CLN, que são utilizados no tratamento da toxoplasmose. Antibióticos da classe das fluoroquinolonas, conhecidos inibidores da enzima DNA girase envolvida na replicação do DNA em procariotos, também têm mostrado atividade anti-*T. gondii*. Dentre as fluoroquinolonas já disponíveis no mercado, o enrofloxacino, ciprofloxacino e trovafloxacino já mostraram atividade anti-*T. gondii* (MARTINS-DUARTE et al., 2015) (BARBOSA et al., 2012) (KHAN et al., 1997).

Além de alvos relacionados a manutenção e expressão do seu DNA, o apicoplasto também conta com vias metabólicas como biossíntese de ácidos graxos do tipo II, síntese de fosfolípidios, síntese de isoprenóides, síntese de agregados ferro-enxofre e biossíntese de heme. A perda da capacidade proliferativa observada a partir de nocautes gênicos de proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos e síntese de heme confirmam estas vias como alvos potenciais em *T. gondii* (TJHIN et al., 2020); (MAZUMDAR et al., 2004). Igualmente, *T. gondii* mostrou-se suscetível ao triclosano e a tiolactomicinas, que são conhecidos inibidores da biossíntese de ácido graxo do tipo II (MARTINS-DUARTE et al., 2009; 2016).

Por fim, recentemente através de ensaios fenotípicos foi identificado a actinonin como inibidor da biogênese do apicoplasto. Ensaios de inibição bioquímica e análise de parasitos mutantes demonstraram que a proteína FtsH1, homóloga a metaloprotease de membrana procariota, localizada na membrana do apicoplasto é o alvo da actinonin (AMBERG-JOHSON et al., 2017).

#### 2.4.2.2 Mitocôndria

Assim como o apicoplasto, a mitocôndria de *T. gondii* tem o seu potencial quimioterápico validado, já que é o alvo da ATV. A mitocôndria em *T. gondii* contém todas as enzimas necessárias para o ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia transportadora de elétrons (SEEBER et al., 2008) e seria metabolicamente ativa em taquizoítos, mas aparentemente não em bradizoítos, que utilizariam a glicólise como fonte primordial de ATP (DENTON et al., 1996). Dentre os alvos mitocondriais explorados estão os componentes da cadeia transportadora de elétrons, síntese de pirimidinas e a via de isoprenóides.

O complexo *bc1* na cadeia transportadora de elétrons, por ser o alvo da ATV, é continuamente estudado para o desenvolvimento de compostos com atividade anti-*T. gondii*. O complexo *bc1* tem como funções primordiais reduzir o citocromo c a partir dos elétrons transferidos do ubiquinol, transferir prótons para o espaço transmembranar mitocondrial e gerar ubiquinona para a biossíntese de pirimidina. Derivados de quinolonas semelhantes a endoquinas (ELQ) são inibidores da citocromo *bc1* e têm mostrado um efeito experimental potente *in vitro* e *in vivo* tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos (DOGGETT et al., 2012) (ALDAY et al., 2017). Outra enzima mitocondrial com potencial quimioterápico é a diidroorotato desidrogenase (DHODH). A DHODH é uma enzima mitocondrial envolvida na quarta etapa da via de síntese de pirimidinas e sua atividade também é dependente da ubiquinona gerada na cadeia transportadora de elétrons. A síntese de pirimidina é essencial ao *T. gondii* e estudo com inibidores conhecidos da DHODH identificou diversos inibidores com atividade na faixa de micromolar (HORTUA TRIANA et al., 2012). A DHODH também seria o alvo dos inibidores derivados de 1-hidroxi-2-dodecil-4(1*H*)-quinolona, que foram capazes de inibir a proliferação de *T. gondii* na faixa de nanomolar (HEGEWALD; GROSS; BOHNE, 2013).

A via de isoprenóides é outra via encontrada na mitocôndria e um alvo em investigação. Isoprenóides são encontrados em todos os organismos, e possuem importância funcional no metabolismo celular e também influenciam a estrutura e função

das membranas (SACCHETTINI; POULTER, 1997). Em *T. gondii* esta via inicia-se no apicoplasto e termina na mitocôndria. Diferente da via encontrada em animais (via do mevalonato), *T. gondii* utiliza a via do metileritritol (MEP), que é característica de plastídeos de plantas e algas. No apicoplasto ocorre a síntese dos precursores de isoprenóides isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (NAIR et al., 2011), que são então substratos das preniltransferases mitocondriais (LIANG; KO; WANG, 2002). A enzima farnesil difosfato sintase (FPPS) em *T. gondii* é uma enzima bifuncional, catalisando tanto a formação do farnesil difosfato quanto de geranylgeraniol difosfato (LING et al., 2007). A FPPS é o alvo dos inibidores bifosfonatos, que vêm demonstrando atividade anti-*T. gondii* *in vitro* e *in vivo* (MARTIN et al., 2001) (LI et al., 2017).

#### **2.4.2.3 Proteínas Cinases Dependentes de Cálcio (CDPK)**

Como um protozoário intracelular obrigatório, os processos de invasão, estabelecimento da infecção em um vacúolo parasitóforo e o egresso da célula hospedeira são cruciais para a manutenção o ciclo lítico e estabelecimento da infecção no hospedeiro pelo *T. gondii*. Dentre um variado arsenal de proteínas envolvidas nestes processos, as CDPKs têm se destacado como alvo quimioterápico promissor. As CDPKs são uma família de serina/treonina cinases somente encontradas em plantas e protistas, incluindo ciliados e apicomplexas. O genoma de *T. gondii* codifica 12 CDPKs putativas e algumas já foram caracterizadas como cruciais para motilidade, diferenciação, invasão e egresso (CARDEW; VERLINDE; POHL, 2018). A CDPK1 por exemplo está envolvida na secreção dos micronemas no complexo apical e replicação (LOURIDO et al., 2010), e desde a sua caracterização vem sendo explorada por diferentes grupos para o desenho de inibidores seletivos, dentre estes os chamados *bumped kinase inhibitors* (BKI) têm mostrado efeito promissor (CARDEW; VERLINDE; POHL, 2018). Por exemplo, estudo recente mostrou a eficácia do inibidor da CDPK1 BKI-1294 em proteger o aborto e a transmissão vertical em ovelhas experimentalmente infectadas com *T. gondii* (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2019).

#### **2.4.3. Compostos com atividade em cistos teciduais**

A falta de eficácia dos fármacos atuais em erradicar os cistos teciduais de *T. gondii* é sem dúvida um dos calcanhares de Aquiles do tratamento da toxoplasmose. Tratamentos para a fase crônica seriam de suma importância para pacientes imunossuprimidos, para

pacientes crônicos que serão submetidos a transplante de órgãos ou para aqueles que se mostram refratários ao tratamento da toxoplasmose ocular. Dentre as dificuldades em se encontrar um tratamento eficaz para a fase crônica está o fato de que o bradizoíto encistado, por si só, é uma forma de resistência natural do parasito a qualquer tipo de estresse, é um estágio que evoluiu para persistir. Por exemplo, a PIR é um forte indutor da conversão de estágio em taquizoítos (PORTES; DE SOUZA, 2019). Outra dificuldade na busca por tratamentos para a fase crônica está na falta de bons modelos de bradizoítos *in vitro*. Recentemente o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de cistogênese natural utilizando a cepa EGS pode contribuir no *screening in vitro* de moléculas direcionadas aos bradizoítos (PAREDES-SANTOS et al., 2013).

Dentre as moléculas mais promissoras recentemente avaliadas com atividade em bradizoítas destacam-se os derivados ELQ, inibidores da citocromo *bc1*. Os derivados ELQ-271 e ELQ-306 foram capazes de reduzir a carga de cistos em camundongos cronicamente infectados em até 88% (DOGGETT et al., 2012). Dentre os inibidores seletivos de CDPK1, uma série de compostos tem apresentado biodisponibilidade sistêmica e no sistema nervoso central aceitáveis. Estudo da eficácia *in vivo* demonstrou redução da carga parasitária no cérebro de animais tratados com as estruturas contendo pirrolopirimidinas ou 5-aminopirazol-4-carboxamidas (HULVERSON et al., 2019). Outro inibidor que mostrou potencial efeito na infecção crônica foi o fármaco guanabenz, um agonista do receptor alfa-adrenérgico aprovado para o tratamento de hipertensão. Em *T. gondii* guanabenz atua inibindo a desfosforilação do fator IF2-alfa, que está envolvido na indução mediada por estresse da conversão de taquizoítos a bradizoítos (NARASIMHAN et al., 2008). Em *T. gondii* o tratamento com guanabenz foi capaz de conter a proliferação de taquizoítos e prevenir a reativação de bradizoítos encistados *in vitro*. Estudos *in vivo* também mostraram que guanabenz é ativo na infecção aguda e crônica da toxoplasmose (BENMERZOUGA et al., 2015) e também em reverter mudanças comportamentais ocasionadas pela infecção crônica em camundongos (MARTYNOWICZ et al., 2019).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O arsenal limitado para o tratamento da toxoplasmose, associado aos efeitos colaterais e a ineficácia em erradicar a infecção crônica, faz da descoberta de novos tratamentos para esta doença de extrema importância. Avanços recentes na validação de

alvos e ensaios *in vitro*, principalmente em bradizoítos, podem auxiliar na descoberta de compostos ativos e eficazes no tratamento da fase aguda da doença e também na erradicação da infecção crônica.

## 4. REFERÊNCIAS

ALDAY, P.H.; BRUZUAL, I.; NILSEN, A.; POU, S.; et al. Genetic Evidence for Cytochrome b Qi Site Inhibition by 4(1H)-Quinolone-3-Diarylethers and Antimycin in *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e01866-16, 2017.

ALLEGRA, C.J.; KOVACS, J.A.; DRAKE, J.C.; SWAN, J.C.; et al. Potent in vitro and in vivo antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. **J Clin Invest**, v. 79, p. 478-82, 1987.

AMBERG-JOHNSON, K.; HARI, S.B.; GANESAN, S.M.; LORENZI, H.A.; et al. Small molecule inhibition of apicomplexan FtsH1 disrupts plastid biogenesis in human pathogens. **Elife**, v. 6, p: e29865, 2017.

ANDERSON, K.S. Understanding the molecular mechanism of substrate channeling and domain communication in protozoal bifunctional TS-DHFR. **Protein Eng Des Sel**, v. 30, p.253-261, 2017.

ARANTES, T.E.; SILVEIRA, C.; HOLLAND, G.N.; MUCCIOLI, C.; et al. Ocular Involvement Following Postnatally Acquired *Toxoplasma gondii* Infection in Southern Brazil: A 28-Year Experience. **Am J Ophthalmol**, v. 159, p. 1002-1012, 2015

ARAUJO, F.G.; REMINGTON, J.S. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 5, p. 647-51, 1974.

ARAUJO, F.G.; HUSKINSON, J.; REMINGTON, J.S. Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, p.293-299, 1991.

ASPINALL, T.V.; JOYNSON, D.H.; GUY, E.; HYDE, J.E.; SIMS, P.F. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 185, p.1637-1643, 2002.

BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; FERRO, E.A.; NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SILVA, N.M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Vet Parasitol**, v. 187, p. 44-52, 2012.

BANNO, K.; IIDA, M.; YANOKURA, M.; IRIE, H.; et al. Drug repositioning for gynecologic tumors: a new therapeutic strategy for cancer. **Scientific World Journal**, v. 2015, p.e341362, 2015.

- BECKERS, C.J.; ROOS, D.S.; DONALD, R.G.; LUFT, B.J.; et al. Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. **J Clin Invest**, v. 95, p.367-376, 1995.
- BENMERZOUGA, I.; CHECKLEY, L.A.; FERDIG, M.T.; ARRIZABALAGA, G.; et al. Guanabenz repurposed as an antiparasitic with activity against acute and latent toxoplasmosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 6939-6945, 2015.
- BOGACZ, J. Comparative Effect of Various Synthetic Agents and Various Antibiotics, Including Spiramycin, on *Toxoplasma*. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 47, p. 903-915, 1954.
- BONFIOLI, A.A.; OREFICE, F. Toxoplasmosis. **Semin Ophthalmol**, v. 20, p.129-141, 2005.
- BOURGET, P.; LESNE-HULIN, A.; FORESTIER, F.; DESMARIS, V.; DULAC, E. Prevention of congenital toxoplasmosis with spiramycin; value and limits of levels in amniotic fluid. **Therapie**, v. 51, p.685-687, 1996.
- CARDEW, E.M.; VERLINDE, C.L.M.J.; POHL, E. The calcium-dependent protein kinase 1 from *Toxoplasma gondii* as target for structure-based drug design. **Parasitology**, v.145, p.210-218, 2018.
- COELHO, L.; CARDOSO, S.W.; AMANCIO, R.T.; MOREIRA, R.I.; et al. Trends in AIDS-defining opportunistic illnesses incidence over 25 years in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v.9, p.e98666, 2014.
- CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.; MONTOYA, J.G. **Etiologic Agents of Infectious Diseases**. In: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 4th edition 2012.
- DANNEMANN, B.R.; ISRAELSKI, D.M.; REMINGTON, J.S. Treatment of toxoplasmic encephalitis with intravenous clindamycin. **Arch Intern Med**, v.148, n.11, p.2477-2482, 1988.
- DENTON, H.; ROBERTS, C.W.; ALEXANDER, J.; THONG, K.W.; COOMBS, G.H. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiol Lett**, v.137, p.103-108, 1996.
- DOGGETT, J.S.; NILSEN, A.; FORQUER, I.; WEGMANN, K.W.; et al. Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. **PNAS**, v. 109, p.15936-15941, 2012.
- DUNAY, I.R.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J.G. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. **Clin Microbiol Rev**, v.31, p.e00057-17, 2018.
- EYLES, D.E. The present status of the chemotherapy of toxoplasmosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 2, p. 429-444, 1953.

- EYLES, D.E.; COLEMAN, N. Tests of 2,4-diaminopyrimidines on toxoplasmosis. **Public Health Rep**, v. 67, p. 249-252, 1952.
- EYLES, D.E.; COLEMAN, N. Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. **Antibiot Chemother (Northfield)**, v.3, p.483-490, 1953.
- FALCO, E.A.; GOODWIN, L.G.; HITCHINGS, G.H.; ROLLO, I.M.; RUSSELL, P.B. 2:4-Diamino-pyrimidines - a new series of antimalarials. **Br J Pharmacol Chemother**, v.6, p.185-200, 1951.
- FLEGR, J.; HORÁČEK, J. Negative Effects of Latent Toxoplasmosis on Mental Health. **Front Psychiatry**, v.10, p.e1012, 2020.
- GILES, A.; FOUSHEE, J.; LANTZ, E.; GUMINA, G. Sulfonamide allergies. **Pharmacy (Basel)**, v.7, p.e132, 2019.
- GUIMARAES, F.N. Toxoplasmosse humana: meningoencefalomielite toxoplasmica: ocorrência em adulto e recém nascido. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.38, p.257-320, 1943.
- GUTTERIDGE, W.E. 566C80, an antimalarial hydroxynaphthoquinone with broad spectrum: experimental activity against opportunistic parasitic infections of AIDS patients. **J Protozool**, v.38, p.141-143, 1991.
- HARRIS, C.; SALGO, M.P.; TANOWITZ, H.B.; WITTNER, M. In vitro assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis**, v. 157, p. 14-22, 1988.
- HEGEWALD, J.; GROSS, U.; BOHNE, W. Identification of dihydroorotate dehydrogenase as a relevant drug target for 1-hydroxyquinolones in *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 190, p. 6-15, 2013.
- HITCHINGS G. H. Daraprim as an antagonist of folic and folinic acids. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, p. 467-473, 1952.
- HOPPER, A.T.; BROCKMAN, A.; WISE, A.; GOULD, J.; et al. Discovery of Selective *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase Inhibitors for the Treatment of Toxoplasmosis. **J Med Chem**, v. 62, p.1562-76, 2019.
- HORTUA TRIANA, M.A.; HUYNH, M.H.; GARAVITO, M.F.; FOX, B.A.; et al. Biochemical and molecular characterization of the pyrimidine biosynthetic enzyme dihydroorotate dehydrogenase from *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 184, p. 71-81, 2012.
- HUDSON, A.T.; DICKINS, M.; GINGER, C.D.; GUTTERIDGE, W.E.; et al. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. **Drugs Exp Clin Res**, v. 17, p. 427-435, 1991.
- HUGHES, W.; LEOUNG, G.; KRAMER, F.; BOZZETTE, S.A.; et al. Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. **N Engl J Med**, v. 328, p.1521-1527, 1993.

HULVERSON, M.A.; BRUZUAL, I.; MCCONNELL, E.V.; HUANG, W.; et al. Pharmacokinetics and In Vivo Efficacy of Pyrazolopyrimidine, Pyrrolopyrimidine, and 5-Aminopyrazole-4-Carboxamide Bumped Kinase Inhibitors against Toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 219, p. 1464-73, 2019.

IACCHERI, B.; FIORE, T.; PAPADAKI, T.; ANDROUDI, S.; et al. Adverse drug reactions to treatments for ocular toxoplasmosis: a retrospective chart review. **Clin Ther**, v. 30, p.2069-2074, 2008.

JACOBSON, J.M.; HAFNER, R.; REMINGTON, J.; FARTHING, C.; et al. Dose-escalation, phase I/II study of azithromycin and pyrimethamine for the treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS. **AIDS**, v.15, p.583-589, 2001.

JANOUSHKOVEC, J.; TIKHONENKOV, D.V.; BURKI, F.; HOWE, A.T.; et al. Factors mediating plastid dependency and the origins of parasitism in apicomplexans and their close relatives. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.112, p.10200-10207, 2015.

KATLAMA, C.; DE WIT, S.; O'DOHERTY, E.; VAN GLABEKE, M.; CLUMECK, N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 22, p.268-275, 1996.

KESSEL, J.J.; LANGE, B.B.; MERBITZ-ZAHRADNIK, T.; ZWICKER, K.; et al. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. **J Biol Chem**, v.278, p.31312-31318, 2003.

KHAN, A.A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F.G.; POLZER, R.J.; REMINGTON, J.S. Activity of trovafloxacin in combination with other drugs for treatment of acute murine toxoplasmosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, p.893-897, 1997.

LOURIDO, S.; SHUMAN, J.; ZHANG, C.; SHOKAT, K.M.; HUI, R.; SIBLEY, L.D. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. **Nature**, v.465, p.359-362, 2010.

LI, Z. H.; LI, C.; SZAJNMAN, S.H.; RODRIGUEZ, J.B.; MORENO, S.N.J. Synergistic Activity between Statins and Bisphosphonates against Acute Experimental Toxoplasmosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. e02628-16, 2017.

LIANG, P.H.; KO, T.P.; WANG, A.H. Structure, mechanism and function of prenyl-transferases. **Eur J Biochem.**, v. 269, p. 3339-54, 2002.

LING, Y.; LI, Z. H.; MIRANDA, K.; OLDFIELD, E.; MORENO, S. N; The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. **J Biol Chem**, v. 282, p.30804-16, 2007

LUFT, B.J.; BROOKS, R.G.; CONLEY, F.K.; MCCABE, R.E.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **JAMA**, v.252, p.913-917, 1984.

MARTIN, M.B.; GRIMLEY, J.S.; LEWIS, J.C.; HEATH, H.T.; et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*

*donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J Med Chem**, v. 44, p. 909-916, 2001.

MARTINS-DUARTE, É.S.; CARIAS, M.; VOMMARO, R.; SUROLIA, N.; DE SOUZA, W. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 129, p.3320-3331, 2016.

MARTINS-DUARTE, E.S.; DUBAR, F.; LAWTON, P.; DA SILVA, C.F.; et al. Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v.10, p.e0125705, 2015.

MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. *Toxoplasma gondii*: fluconazole and itraconazole activity against toxoplasmosis in a murine model. **Exp Parasitol**, v.124, p. 466-469, 2010.

Martins-Duarte, E.S.; Jones, S.M.; Gilbert, I.H.; Atella, G.C.; de Souza W.; Vommaro, R.C. Thiolactomycin analogues as potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. **Parasitol Int**, v.58, p.411-415, 2009.

MARTINS-DUARTE, É.S.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. **Exp Parasitol**, v. 133, p. 294-299, 2013.

MARTYNOWICZ, J.; AUGUSTO, L.; WEK, R.C.; BOEHM, S.L. SULLIVAN, W.J. JR. Guanabenz Reverses a Key Behavioral Change Caused by Latent Toxoplasmosis in Mice by Reducing Neuroinflammation. **MBio**, v.10, p.e381-319, 2019.

MASSIMINE, K.M.; DOAN, L.T.; ATREYA, C.A.; STEDMAN, T.T.; et al. *Toxoplasma gondii* is capable of exogenous folate transport. A likely expansion of the BT1 family of transmembrane proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v.144, p.44-54, 2005.

MAZUMDAR, J.; WILSON E.H.; MSEK, K.; HUNTER, C.A.; STRIEPEN, B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. **PNAS**, v.103, p.13192-13197, 2006.

NAIR, S.C.; BROOKS, C.F.; GOODMAN, C.D.; STURM, A.; et al. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**, v. 208, p. 1547-1559, 2011.

NARASIMHAN, J.; JOYCE, B.R.; NAGULESWARAN, A.; SMITH, A.T.; et al. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, v. 283, p. 16591-601, 2008.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Acad Sci**, v.147, p.e736, 1908.

OZ, H.S. Toxoplasmosis complications and novel therapeutic synergism combination of diclazuril plus atovaquone. **Front Microbiol**, v. 5, p.e484, 2014.

PAREDES-SANTOS, T.C.; MARTINS-DUARTE, E.S.; VITOR, R.W.; DE SOUZA, W.; et al. Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int**, v.62, p.181-188, 2013.

PEARSON, P.A.; PIRACHA, A.R.; SEN, H.A.; JAFFE, G.J. Atovaquone for the treatment of toxoplasma retinochoroiditis in immunocompetent patients. **Ophthalmology**, v. 106, p.148-153, 1999.

PFEFFERKORN, E.R.; BOROTZ, S.E.; NOTHNAGEL, R.F. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to sulfonamides. **Exp Parasitol**, v.74, p.261-270, 1992.

PFEFFERKORN, E.R.; NOTHNAGEL, R.F.; BOROTZ, S.E. Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 1091-1096, 1992.

PORTES, J.A.; DE SOUZA, W. Development of an in vitro system to study the developmental stages of *Toxoplasma gondii* using a genetically modified strain expressing markers for tachyzoites and bradyzoites. **Parasitol Res**, v.118, p.3479-3489, 2019.

REYNALDS, M.G.; OH, J.; ROOS, D.S. In vitro generation of novel pyrimethamine resistance mutations in the *Toxoplasma gondii* dihydrofolate reductase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 1271-7, 2001.

Rustum, Y.M. Thymidilate synthase: a critical target in câncer therapy? **Front Biosci**, v.9, p.2467-2473, 2004.

SACCHETTINI, J.C.; POULTER, C.D. Creating Isoprenoid diversity. *Science.*, v.277, p.1788-1789, 1997.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, R.; FERRE, I.; RE, M.; RAMOS, J.J.; et al. Treatment with Bumped Kinase Inhibitor 1294 Is Safe and Leads to Significant Protection against Abortion and Vertical Transmission in Sheep Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii* during Pregnancy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, p.e2527-25218, 2019.

SCHWARTZMAN, J.D.; PFEFFERKORN, E.R. Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v.67, p.150-158, 1981.

SEEBER, F.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. **Trends Parasitol**, v. 24, p.468-478, 2008.

SILVA, L.A.; FERNANDES, M.D.; MACHADO, A.S.; REIS-CUNHA, J.L.; et al. Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. **Exp Parasitol**, v. 202, p.7-14, 2019.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo**, v. 3, p.109-112, 1908.

TABBARA, K.F.; O'CONNOR, G.R. Treatment of ocular toxoplasmosis with clindamycin and sulfadiazine. **Ophthalmology**, v. 87, p.129-34, 1980.

TJHIN, E.T.; HAYWARD, J.A.; MCFADDEN, G.I.; VAN DOOREN, G.G. Characterization of the apicoplast-localized enzyme *TgUroD* in *Toxoplasma gondii* reveals a key role of the apicoplast in heme biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 295, p. 1539-1550, 2020.

TORRE, D.; CASARI, S.; SPERANA, F.; DONISI, A.; et al. Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p.1346-1349, 1988.

VAN BAMBEKE, F.; MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Mechanisms of Action. **Infectious Diseases**, v.2017, p.1162–1180, 2017.

VAN DOOREN, G.G.; STRIEPEN, B. The algal past and parasite present of the apicoplast. **Annu Rev Microbiol**, v.67, p.271-289, 2013.

WILDER, H.C. *Toxoplasma* chorioretinitis in adults. **Arch Opthal (Chicago)**, v.48. p.127-137, 1952.

WILSON, R.J.; DENNY, P.W.; PREISER, P.R.; RANGACHARI, K.; et al. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Mol Biol**, v.261, p.155-172, 1996.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, v. 89, p. 226-227, 1939

ZAMORA, Y.F.; ARANTES, T.; REIS, F.A.; GARCIA, C.R.; et al. Local treatment of toxoplasmic retinochoroiditis with intravitreal clindamycin and dexamethasone. **Arq Bras Oftalmol**, v.78, p.216-219, 2015.

ZHANG, Y.; LIN, X.; LU, F. Current treatment of ocular toxoplasmosis in immuno-competent patients: a network meta-analysis. **Acta Trop**, v.185, p.52-62, 2018.

ZHOU, Y.; FOMOVSKA, A.; MUENCH, S.; LAI, B.S.; et al. Spiroindolone that inhibits PfATPase4 is a potent, cidal inhibitor of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro and in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 1789-1792, 2014.

## ORGANIZADORES

### Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti



Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA (2007), Especialista em Didática e Metodologia do Ensino Superior, Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada pela Universidade Luterana do Brasil - ULBRA (2011) e Doutorado em Biologia Experimental pela Universidade Federal de Rondônia – UNIR (2015). É docente da Universidade Federal do Acre (UFAC) e professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental (MECS). É coordenador do Laboratório de Medicina Tropical (LabMedt) da UFAC, onde desenvolve pesquisas principalmente na área da Relação Parasito-Hospedeiro.

### Jader de Oliveira



Graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura Plena) pela Universidade de Araraquara UNIARA, possui o título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2015). Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2019). Apresenta experiência em taxonomia de grupos de Reduviidae (ênfase em Triatominae), curadoria de coleções entomológicas, levantamento (metodologias de coleta e processamento de amostras) e inventariamento da entomofauna e sistemática e evolução de Triatominae.

### Luís Marcelo Aranha Camargo



Possui graduação em Medicina - ABC Fundação (1985), Residência Médica pela Universidade Federal de São Paulo (1987), Mestrado em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo (1993) e Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) pela Universidade de São Paulo (1999). É Docente da Universidade de São Paulo e do Centro Universitário São Lucas, Vice-Coordenador do INCT-EPIAmO/CNPq e responsável pelo Instituto de Ciências Biomédicas 5 da Universidade de São Paulo (ICB-5-USP), localizado no município de Monte Negro, Rondônia. Trabalha a mais de 25 anos com doenças negligenciadas da amazonia e atenção básica a saúde em comunidades isoladas.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Alvo terapêutico: 68.

Amazônia: 115, 140, 179, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 196, 197, 198, 200, 201, 203, 205, 206, 207, 208, 209, 216, 256, 163 e 165.

### C

Calcineurina (CaN): 319 e 320.

Citóstoma-citofaringe: 29, 32, 33, 35, 36 e 38.

Conexina 43: 162, 164, 169 e 171.

### D

Doença de Chagas: 12, 13, 29, 30, 48, 68, 69, 70, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 86, 87, 88, 94, 95, 96, 97, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 121, 122, 162, 163, 179, 180, 182, 183, 185, 186, 187, 188, 190, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 206, 208, 209, 217, 218, 164 e 194.

Doença Negligenciada: 163 e 227.

Doenças Tropicais: 87, 106, 140, 214, 215, 217, 225, 228, 262 e 289.

### E

Eixo CA-PTH-25(OH)D: 141 e 156.

Endocitose: 29, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41 e 73.

### F

Fatores Ambientais: 144, 256 e 266.

### H

Histonas: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 e 61.

### I

IL-1 $\beta$ : 81, 121, 122, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 e 134.

Leishmaniose Cutânea: 218, 219, 220, 225, 232, 256, 258, 259, 260, 264, 328, 341, 342, 344 e 345.

Leishmaniose Tegumentar: 227, 228, 241, 142, 256, 257, 258, 262, 271 e 272.

Leishmaniose Visceral: 41, 216, 218, 221, 223, 224, 227, 228, 240, 242, 245, 258, 260, 262, 271, 272, 273, 288, 289, 290, 295, 299, 306, 308, 310, 328, 342, 343, 344, 345 e 346.

## M

Macrófago: 72, 73, 75, 76, 78, 79, 81, 95, 113, 116, 117, 127, 128, 129, 162, 164, 168, 169, 170, 175, 230, 244, 306, 310, 313, 314, 316, 319, 324, 325, 326, 328, 329, 330, 331 e 332.

Malária: 140, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 189, 197, 218, 264, 365 e 369.

## P

Patogênese: 68, 70, 77, 78, 81, 87, 125, 126, 129, 219, 243, 320 e 328.

Phlebotominae: 228, 234, 261, 271, 272 e 275.

Produtos Naturais Marinhos: 306, 308 e 316.

Proteína P21: 68, 71, 72, 73, 77, 81 e 82.

Proteínas Quinases: 86, 89 e 90.

Proteínas Recombinantes: 288, 294, 295 e 297.

## R

Regulação do Ciclo Celular: 12, 22 e 23.

Resistência: 32, 74, 95, 223, 225, 309, 340, 341, 342, 343, 344, 346, 347, 363, 370 e 375.

## S

Saúde Coletiva: 214.

Sinalização Celular: 34, 86, 89, 90 e 94.

## T

Toxoplasmose Congênita: 357, 358, 359, 360 e 361.

Tripanossomíase: 30, 163, 179, 196 e 197.

*Trypanosoma cruzi*: 12, 13, 29, 30, 48, 49, 59, 68, 81, 87, 88, 94, 104, 105, 115, 117, 121, 122, 162, 163, 179, 180, 181, 185, 196, 197, 198, 199 e 325.

## V

Vigilância Epidemiológica: 104, 111, 196, 198, 222, 279, 180 e 301.

Vitamina D: 140, 141, 145, 146, 151, 153, 155 e 156.



DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283136