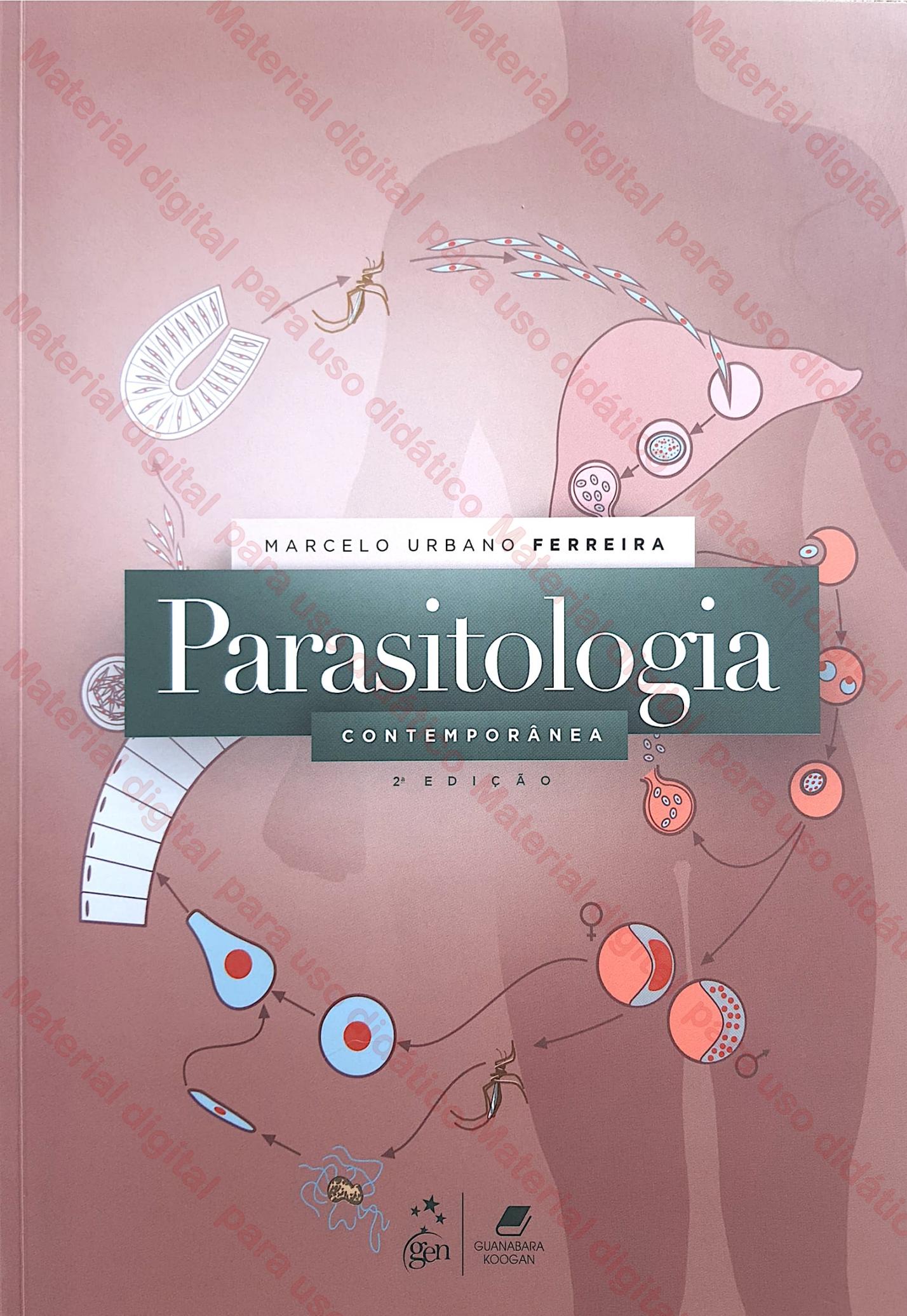


MARCELO URBANO FERREIRA

Parasitologia

CONTEMPORÂNEA

2ª EDIÇÃO



Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas

Ariel Mariano Silber ■ Marcelo Urbano Ferreira

Introdução

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cujo ciclo de vida transcorre entre insetos vetores reduvídeos e hospedeiros mamíferos. A Organização Mundial da Saúde classifica a doença de Chagas entre as 20 doenças tropicais mais negligenciadas, constituindo um importante problema social e econômico nas Américas, com predomínio na América Latina. O ciclo natural ocorre exclusivamente nas Américas, onde o inseto vetor está presente. Com base no achado de DNA do parasito em tecidos de múmias de civilizações pré-colombianas, acredita-se que *T. cruzi* infecte populações humanas há pelo menos 4.000 anos (Aufderheide et al., 2004). Verifica-se infecção humana por via vetorial no México e em todos os países da América Central e do Sul, com 6 a 7 milhões de indivíduos infectados. No Brasil, estima-se a existência de 1 milhão de portadores de infecção.

Os vetores da doença de Chagas são insetos hemípteros hematófagos da família Reduviidae. Das 140 espécies conhecidas de triatomíneos, distribuídas em 18 gêneros, somente algumas dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são reconhecidas como vetores da doença de Chagas. Dentre estas, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as mais relevantes na transmissão humana. O parasito circula entre mais de 150 espécies de animais domésticos (cães, gatos, cobaias, hamsters) e silvestres (roedores, marsupiais, tatus), que constituem o reservatório de infecção. A área de transmissão enzoótica abrange desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e Chile.

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez, em 1909, pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas. Em um caso único na história da Medicina, ele descreveu, além da doença, o seu agente etiológico, o ciclo de transmissão, os hospedeiros vertebrados e os vetores, bem como as manifestações clínicas da fase aguda no primeiro caso humano estudado.

Tripanossomas

Segundo a classificação tradicional de Norman Levine, *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, que reúne protozoários com cinetoplasto, uma estrutura intramitocondrial. O cinetoplasto está composto por DNA constituinte do genoma mitocondrial (aproximadamente 30% do DNA total da célula) com uma organização fibrilar (kDNA) e proteínas associadas. Nessa ordem, *T. cruzi* localiza-se na família Trypanosomatidae, que

reúne organismos com o kDNA em forma de rede e que apresentam um único flagelo emergindo de um bolso flagelar anterior ou lateral, neste último caso unido ao corpo (Levine et al., 1980). Todos os tripanossomatídeos são parasitos.

A classificação tradicional dos protistas, entretanto, tem sido revista nas últimas décadas, com a definição de agrupamentos de organismos que não correspondem aos níveis taxonômicos tradicionais como famílias e ordens (Adl et al., 2005). Nesse novo esquema de classificação, os cinetoplastídeos pertenceriam ao subgrupo taxonômico Kinetoplastea do grupo Euglenozoa, por sua vez membro do supergrupo Excavata. No subgrupo Kinetoplastea encontra-se o agrupamento Metakinoplastina, definido com base na análise de seqüências de gene de RNA ribossômico, que compreende, entre outros, o clado Trypanosomatida. Este último agrupamento, na classificação mais recente, corresponde à família Trypanosomatidae tradicional.

O clado Trypanosomatida contém os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Rinchoiomonas*, *Sauroleishmania*, *Trypanosoma* e *Wallaceina*. Desses, apenas dois reúnem espécies causadoras de doença humana: *Trypanosoma* e *Leishmania*. No gênero *Trypanosoma* encontram-se, além de *T. cruzi*, *T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*, que produzem a doença do sono ou tripanossomíase africana em populações humanas de extensas áreas da África. *Trypanosoma rangeli* é eventualmente encontrado nas Américas em infecções assintomáticas no homem e em animais silvestres e domésticos. Este capítulo, entretanto, restringe-se a *T. cruzi*, único tripanossoma causador da doença de Chagas.

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi apresenta grande diversidade biológica, associada à sua distribuição geográfica, ao grande número de mamíferos que podem ser infectados e, potencialmente, à variedade das manifestações clínicas e de resposta ao tratamento em pacientes. Desde a década de 1960, observa-se grande polimorfismo morfológico e de comportamento biológico em *T. cruzi* (Brener, 1973). No fim da década de 1970, técnicas bioquímicas e moleculares evidenciaram a existência de extensa diversidade genética em *T. cruzi*. Esses resultados levaram à criação de diferentes tipos de classificação infraespecífica. Os isolados de *T. cruzi* foram inicialmente agrupados com base em padrões de migração de isoenzimas em eletroforese; cada grupo de isolados com características semelhantes, com base nesse critério, forma um zimodema. Com o desenvolvimento

de técnicas de tipagem molecular e de sequenciamento de DNA, surgiram novos critérios para classificar isolados e cepas de *T. cruzi*. Com base em diferenças de tamanho de produtos de digestão do kDNA, com enzimas de restrição foram propostos, na década de 1980, os agrupamentos conhecidos como *esquizodemas*. No final da década de 1990, observou-se que *T. cruzi* podia ser classificado em dois grupos majoritários (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II, com alguns isolados híbridos), a partir da análise de seqüências dos genes de RNA ribossômico (Souto et al., 1996). Com a análise de maior número de isolados e cepas, o grupo *T. cruzi* II foi progressivamente subdividido em IIa, IIb, IIc, IID e IIe. Em 2009, chegou-se a um consenso que reconhece o agrupamento dos isolados em seis linhagens genéticas denominadas *unidades discretas de tipagem* ou *discrete typing units* (DTU, na sigla em inglês), numerados com algarismos romanos de I a VI (Zingales et al., 2009). Mais recentemente, incorporou-se uma sétima linhagem de *T. cruzi* originariamente isolada de morcegos, denominada por esse motivo *Tcbat*. Devido a sua identificação e incorporação recente como sétima DTU, até agora um único caso de infecção humana foi relatado (Zingales, 2018).

Propõem-se associações entre parasitos agrupados nas diferentes DTUs e algumas características epidemiológicas, distribuição geográfica e patogenicidade da infecção. TcI e TcII são provavelmente as duas linhagens subespecíficas que divergiram há mais tempo. Predominam no sul e na região central da América do Sul. TcIII apresenta uma distribuição geográfica mais ampla, desde o noroeste da Venezuela até a Argentina. TcIV é encontrada na América do Norte e do Sul; porém, algumas análises nas quais foram utilizados múltiplos marcadores genéticos apontam para divergências entre isolados de cada região do continente. TcV e TcVI predominam no norte da América do Sul. Finalmente, a linhagem Tcbat foi isolada no Brasil, Panamá e Colômbia.

Trypanosoma cruzi é encontrado em mamíferos e insetos vetores em três tipos de ambientes diferentes que se sobrepõem: silvestre, peridoméstico e doméstico. Diferentes DTUs predominam em cada um desses ecossistemas. TcI é frequentemente encontrada em ecossistemas silvestres, mas também em infecções humanas na Amazônia e em países do norte da América do Sul. TcII, TcV e TcVI participam predominantemente de ciclos de infecção domésticos e peridomésticos, e são frequentemente encontradas em populações humanas, animais domésticos e pequenos roedores silvestres. TcIII e TcIV são majoritariamente associadas ao ciclo silvestre, tendo sido isoladas principalmente de animais selvagens. Porém, são conhecidos alguns casos de infecções humanas e de animais domésticos (cães) por essas DTUs.

Em relação ao perfil clínico da infecção, há indícios de associação entre certas DTUs e determinadas manifestações clínicas da doença de Chagas. Vários estudos têm apontado o predomínio de TcI em pacientes com as formas indeterminada ou cardíaca da infecção crônica no Norte da América do Sul e na América Central, enquanto outros estudos mostram predomínio de TcII, TcV e TcVI em pacientes com a fase crônica nas formas cardíaca e, especialmente, digestiva. Na região Sul do Brasil, TcII predomina entre os pacientes crônicos analisados até agora (Zingales, 2018).

As últimas propostas para uma taxonomia subespecífica relatadas anteriormente parecem ter uma base sólida e estável: em geral, novos isolados podem ser classificados em algum dos DTUs previamente estabelecidos sem maiores problemas.

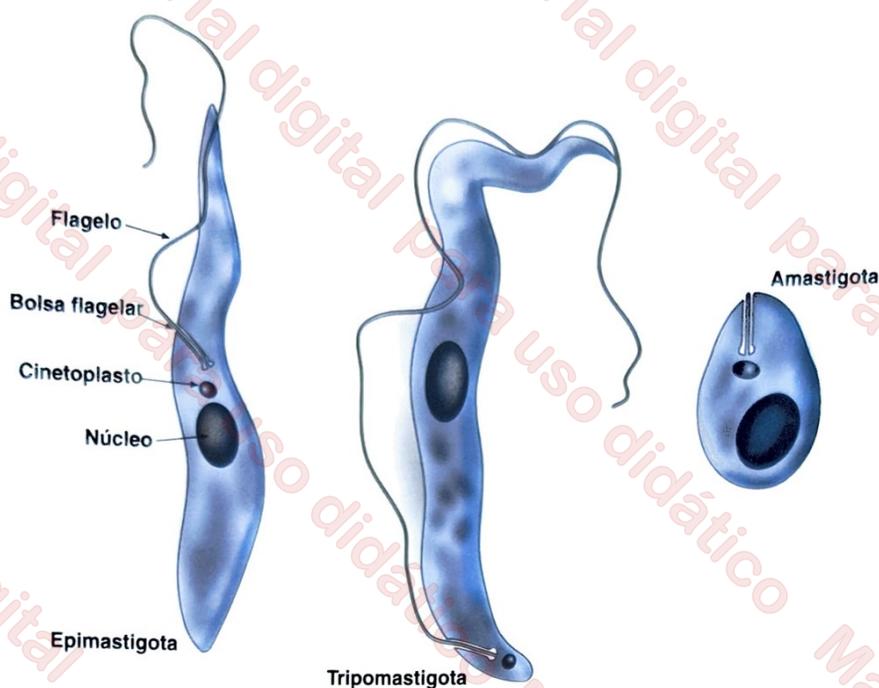
Essa estabilidade populacional depende do fato de as populações de *T. cruzi* apresentarem uma estrutura majoritariamente clonal. Porém, registram-se eventos de coinfeção no vetor e no hospedeiro mamífero por parasitos de diferentes DTUs; em ambos os hospedeiros, pode haver troca de material genético, o que poderia resultar em novas formas híbridas entre os DTUs existentes.

Aspectos biológicos

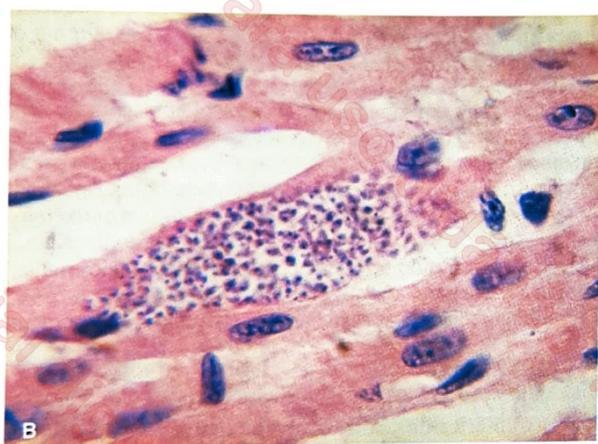
Os principais estágios do parasito encontrados em diferentes porções do tubo digestório do vetor são os *epimastigotas* (estágios capazes de dividir-se, mas não de infectar células) e os *tripomastigotas metacíclicos* (estágios infectantes, mas sem capacidade de dividir-se). Porém, descrevem-se também outros estágios intermediários, de presença transitória, como o *esferomastigota* (estágio capaz de replicação sem flagelo aparente). No hospedeiro mamífero, predominam os *amastigotas* (estágios capazes de dividir-se, mas pouco infectantes para células) no interior de células nucleadas e os *tripomastigotas* (que não se reproduzem, mas são muito infectantes) na corrente sanguínea. Neste caso, também foram observadas e caracterizadas formas intracelulares intermediárias que apresentam semelhanças bioquímicas e morfológicas com os *epimastigotas*, denominadas *epimastigotas intracelulares*. As características morfológicas de *epimastigotas*, *tripomastigotas* e *amastigotas* são apresentadas na Figura 5.1. Apesar de certo pleomorfismo, cada estágio pode ser identificado com base em parâmetros como a morfologia geral da célula e as posições relativas do flagelo, do núcleo e do cinetoplasto, bem como a partir de suas propriedades biológicas e de sua constituição proteica.

Os *amastigotas* de *T. cruzi* são tipicamente arredondados ou ovoides, medem aproximadamente 3 a 5 µm de diâmetro e apresentam um flagelo incipiente que não chega a emergir do bolso flagelar e o cinetoplasto próximo do núcleo. Os *amastigotas* ocorrem principalmente durante o ciclo intracelular na infecção dos mamíferos, constituindo o principal estágio reprodutivo nesses hospedeiros. Multiplicam-se por fissão binária no citoplasma das células infectadas.

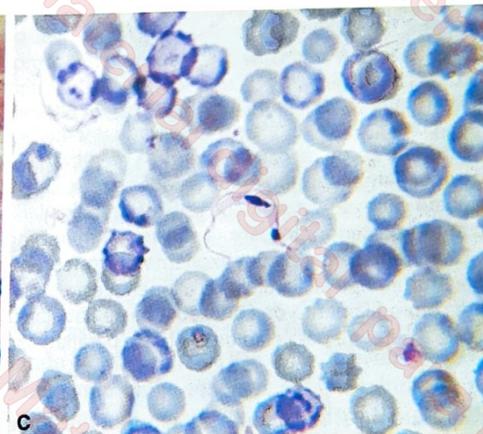
Os *tripomastigotas* são formas extracelulares alongadas, de aproximadamente 15 µm de comprimento, que apresentam um flagelo que emerge do bolso flagelar na parte posterior da célula e a percorre longitudinalmente até a parte anterior, ligado à membrana. O flagelo produz movimento ondulatório na região da membrana à qual está associado; por isso, o complexo que compreende o flagelo e a membrana é denominado *membrana ondulante*. No *tripomastigota*, o cinetoplasto está situado em posição posterior ao núcleo. No hospedeiro vertebrado, os *tripomastigotas* são encontrados majoritariamente no sangue, e são conhecidos como *tripomastigotas sanguícolas* ou *sanguíneos*. Nos triatomíneos, são encontrados *tripomastigotas* na extremidade distal do tubo digestório; são denominados *tripomastigotas metacíclicos*. Os *tripomastigotas* não se reproduzem, mas são as principais formas infectantes do parasito. Apesar da semelhança morfológica e biológica, *tripomastigotas metacíclicos* e *sanguícolas* diferem quanto ao metabolismo e ao perfil de expressão de proteínas, bem como quanto aos mecanismos de infecção celular.



A



B



C

FIGURA 5.1 Estágios evolutivos de *Trypanosoma cruzi*. A. Representação esquemática da morfologia dos principais estágios encontrados ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. Observe, em cada estágio, a posição relativa do núcleo e do flagelo; em amastigotas, o flagelo rudimentar não chega a emergir do bolso flagelar. B. Corte histológico que mostra ninho de amastigotas de *T. cruzi* na musculatura esquelética cardíaca (coloração: hematoxilina-eosina). C. Tripomastigota em esfregaço sanguíneo (coloração: Giemsa). (Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.)

Os epimastigotas são estágios extracelulares alongados, medem aproximadamente 20 μm de comprimento e apresentam o cinetoplasto situado em posição anterior, mas próximo ao núcleo. O flagelo também forma uma membrana ondulante, porém mais curta e menos evidente. Os epimastigotas são encontrados no intestino médio dos triatomíneos, onde se multiplicam abundantemente por fissão binária. São as únicas formas capazes de reproduzir-se que podem ser mantidas em cultivo axênico.

Organização celular

Trypanosoma cruzi apresenta diversas peculiaridades em sua organização celular, a maior parte delas características também de outros organismos do subgrupo Trypanosomatida

(Figura 5.2A). Todas as formas de *T. cruzi* têm um único flagelo na região anterior. O flagelo está composto por um axonema de estrutura clássica (nove pares de microtúbulos externos e um par central), e uma estrutura fibrilar proteica que o percorre longitudinalmente, denominada haste paraflagelar (Figura 5.2B). O flagelo emerge de uma estrutura denominada bolso flagelar, formada por uma invaginação de uma região da membrana celular do parasito. O bolso flagelar, além de ser a região de emergência do flagelo, é um sítio ativo de troca de moléculas entre os meios extracelular e intracelular; a maior parte dos processos endocíticos e exocíticos ocorre nesse local. Em uma região próxima ao bolso flagelar existe uma segunda estrutura envolvida na endocitose de partículas, o citóstoma (de Souza, 2009).

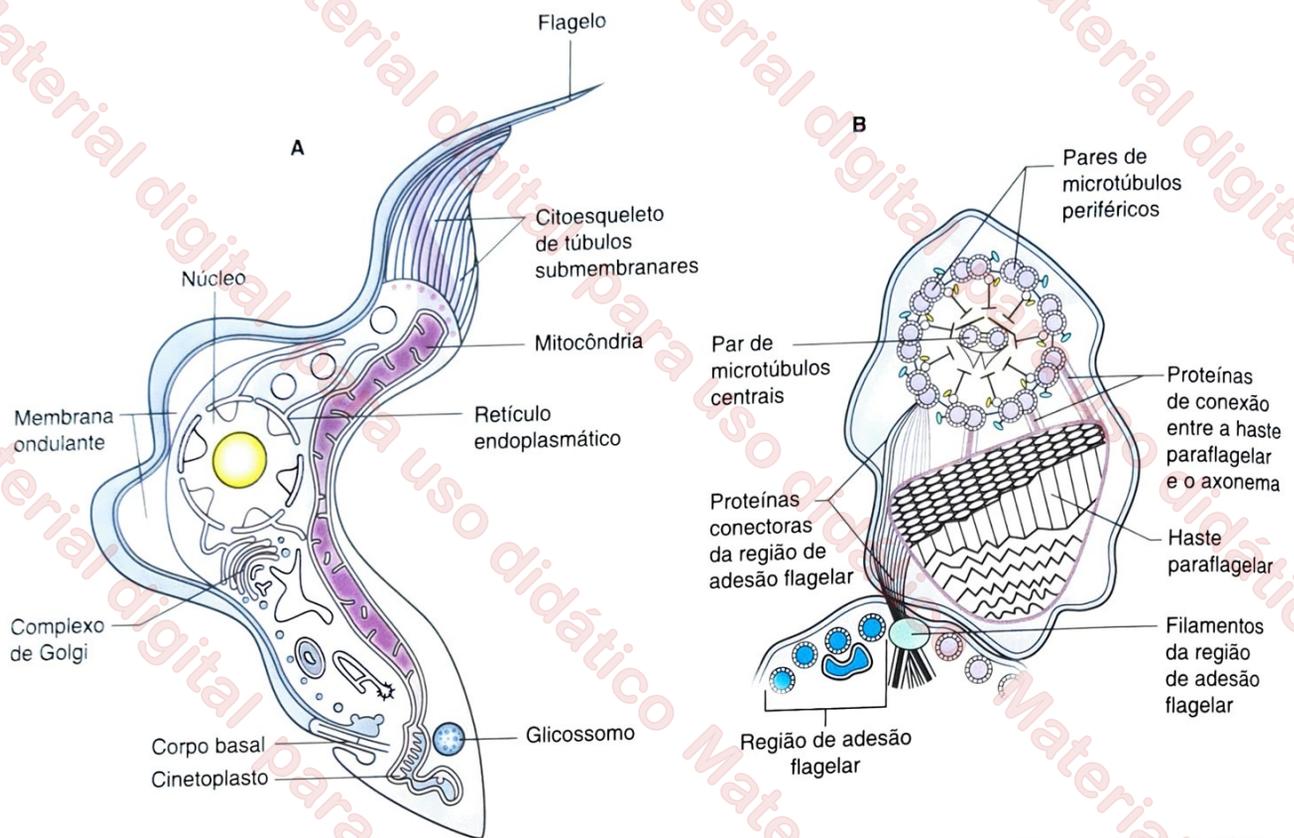


FIGURA 5.2 Esquemática dos principais aspectos da ultraestrutura celular de um tripanossomatídeo. A. Representação da célula com seus principais componentes. Pode ser observado um núcleo típico, um único flagelo nascendo dentro do bolso flagelar e percorrendo praticamente todo o corpo da célula, aderido à membrana, uma mitocôndria tubular de grande tamanho contendo o cinetoplasto no extremo posterior. Também estão representados o retículo endoplasmático, com o sistema de Golgi, e os glicossomos. Finalmente, há uma representação do citoesqueleto subcortical (ou subpelicular) em forma de corte transversal dos microtúbulos que percorrem o parasito em sentido anteroposterior por baixo do plano da membrana citoplasmática. B. Detalhe de corte transversal do flagelo e a estrutura de adesão. Estão representados um axonema típico (corte transversal) constituído por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (estrutura típica). Paralelo ao axonema está representada a haste paraflagelar, com o sistema de proteínas conectoras com o axonema e com o filamento de conexão à haste flagelar, localizada na região de adesão flagelar, estrutura subjacente à membrana plasmática que a percorre paralelamente à haste paraflagelar.

O citoesqueleto de *T. cruzi* também apresenta peculiaridades. Ele consiste essencialmente de uma rede de microtúbulos de α e β tubulina, entrecruzados entre si e com a membrana plasmática. Embora tenham sido encontrados, no genoma de *T. cruzi*, genes que codificam actina, não foram evidenciados microfilamentos clássicos de actina na composição do citoesqueleto.

Em um domínio específico da membrana plasmática e da membrana flagelar, denominado zona de anexação do flagelo (FAZ, do inglês *flagellum attachment zone*), ocorrem as interações entre o citoesqueleto e o flagelo, que dão origem à membrana ondulante (ver Figura 5.2B). Diferentemente de outras células eucariotas, os microtúbulos percorrem a célula longitudinalmente, subjacentes à membrana plasmática, formando uma estrutura similar a uma gaiola (microtúbulos subpeliculares). Os microtúbulos encontram-se interligados por proteínas associadas a eles. O citoesqueleto, além de fornecer estrutura mecânica às células, determina a sua morfologia; em seções transversais do parasito, observou-se a presença de microtúbulos mais curtos intercalados nas regiões de maior diâmetro.

Trypanosoma cruzi também apresenta uma mitocôndria com características singulares (Paes et al., 2011). Consiste em uma única rede de túbulos com dupla membrana, que percorre

o interior da célula, ocupando entre 15 e 30% do seu volume, dependendo do estágio do ciclo celular e do estado nutricional da célula. Próximo do local de emergência do flagelo, no interior da mitocôndria, encontra-se o cinetoplasto, estrutura em forma de disco cujo plano é sempre perpendicular ao eixo do flagelo (Figura 5.3). O cinetoplasto contém o DNA mitocondrial ou kDNA, que corresponde a cerca de 30% do DNA total da célula. Compreende cerca de 50 maxicírculos, estruturas de DNA circular com aproximadamente 20.000 pares de bases, além de cerca de 20.000 minicírculos, estruturas menores de DNA circular, com aproximadamente 1.500 pares de bases. Os maxicírculos contêm genes que codificam algumas das proteínas mitocondriais. No entanto, como ocorre nos demais cinetoplastídeos, esses genes não codificam as mensageiros completos para a síntese dessas proteínas, devendo ser editados para tornar possível a síntese de proteínas funcionais.

A edição de RNA consiste na mudança sítio-específica da sequência de RNA recém-transcrito (pré-mRNA). Mais especificamente, ocorre adição e/ou remoção de uridinas no pré-mRNA. Participam do processo de edição, além do transcrito primário, diversas enzimas, assim como pequenas moléculas de RNA (RNA guias, ou gRNAs) cujas sequências estão codificadas nos minicírculos. A edição é executada por uma maquinaria multienzimática denominada *editossomo*, complexo

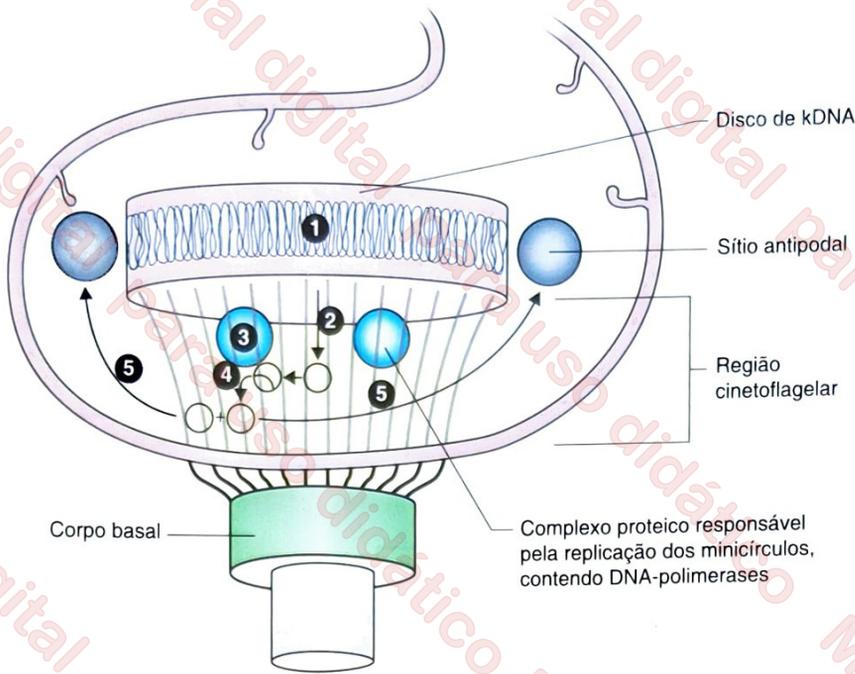


FIGURA 5.3 Representação esquemática do cinetoplasto: estrutura em forma de disco contendo o DNA mitocondrial (kDNA). O cinetoplasto está fisicamente conectado ao corpo basal, estrutura de que se origina o flagelo, mediante a região cinetoflagelar. O DNA está organizado em maxicírculos e minicírculos concatenados, formando uma malha densa. O cinetoplasto contém também complexos constituídos por proteínas estruturais responsáveis por sua organização, proteção, replicação e transcrição, e duas estruturas localizadas de maneira oposta, formadas por um complexo multiproteico denominadas “sítios antipodais”. Os minicírculos (1) são liberados da região interna da rede, com sua abertura e posterior fechamento catalisados por uma topoisomerase (2). Na região cinetoflagelar, são replicados mediante a ação de complexos que contêm DNA polimerases (3). A replicação ocorre a partir de um único sítio por minicírculo, formando as estruturas em forma de “q” (4). Uma vez replicados, cada cópia-filha de cada minicírculo (5) é direcionada para um sítio antipodal diferente, onde são aneladas à parte externa de cada uma das redes-filhas em formação. Sabe-se pouco sobre os mecanismos de replicação dos maxicírculos. Diferentemente dos minicírculos, a sua replicação ocorre sem a sua liberação da rede-mãe. Uma vez replicada a rede, os minicírculos são compactados por enzimas específicas para concluir a formação de um novo cinetoplasto.

do núcleo de edição do RNA ou RECC (do inglês, *RNA editing core complex*). Os sítios do pré-mRNA onde as uridinas serão adicionadas ou removidas são “marcados” pelo pareamento por complementariedade parcial de bases dos gRNAs com o pré-mRNA que será alvo da edição (Figura 5.4A). Esse pareamento parcial produz estruturas em forma de alça tanto no gRNA quanto no RNA alvo. Tais alças não pareadas são utilizadas como “marcas de edição” para a adição ou remoção de uridinas pelo editossomo sempre no RNA alvo (o gRNA nunca é modificado). Desta forma, o processo em cada sítio de edição fica completo quando as alças são totalmente eliminadas. Embora predominem os pareamentos clássicos de Watson e Crick (U-A), pareamentos G-U são também possíveis.

A edição de RNA é um processo muito comum nas mitocôndrias de tripanossomatídeos: ocorre em 12 dos 18 transcritos codificados nos maxicírculos. Esses 12 RNAs imaturos precisam ser editados para reconstituir uma mensagem “traduzível” e originar uma proteína funcional. Embora esse processo tenha sido inicialmente observado em tripanossomatídeos, hoje é considerado amplamente distribuído entre os eucariotos. A edição processa-se em cascata, iniciando-se na extremidade 3’ e progredindo para a extremidade 5’ do pré-mRNA. O editossomo apresenta variantes na sua composição, mas para ser funcional deve conter as enzimas que catalisam um ciclo de edição completo: pelo menos uma endonuclease, ligases de edição de RNA, uma 3’-uridina terminal transferase, uma exoribonuclease uridina-específica e um

RNA helicase. O primeiro passo de um ciclo de edição acontece quando o gRNA hibrida a jusante do primeiro sítio a ser editado, mediante uma sequência complementar ao pré-mRNA que serve como uma âncora. O resultado é um RNA parcialmente de dupla fita, com alças que correspondem a regiões ausentes no pré-mRNA ou no gRNA. A seguir, uma endonuclease cliva o pré-mRNA na região não pareada. Se a alça foi produzida no gRNA, uma uridil-transferase terminal adiciona ao pré-mRNA as uridinas necessárias para estabelecer o pareamento completo com o gRNA. Se a alça for produzida no pré-mRNA, ela é completamente removida pela ação da exoribonuclease uridina específica. Finalmente, uma ligase “sela” as descontinuidades nas uniões fosfodiéster e uma helicase separa as fitas do gRNA e o pré-mRNA editado, para o processo prosseguir em outra posição (Paes et al., 2011; Read et al., 2016) (Figura 5.4B).

Outra organela típica dos cinetoplastídeos, semelhante ao peroxissomo encontrado em outros protozoários, é o *glicosomo*, onde ocorre parte da glicólise (Haanstra et al., 2016). O glicosomo tem uma membrana com uma única camada de fosfolípidios, delimitando uma matriz de conteúdo proteico elétron-denso. No glicosomo encontram-se enzimas da via glicolítica; em sua matriz, os componentes proteicos majoritários são as enzimas hexoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, fosfofrutoquinase, aldolase, triosefosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfogliceratoquinase, glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerolquinase. No glicosomo, a

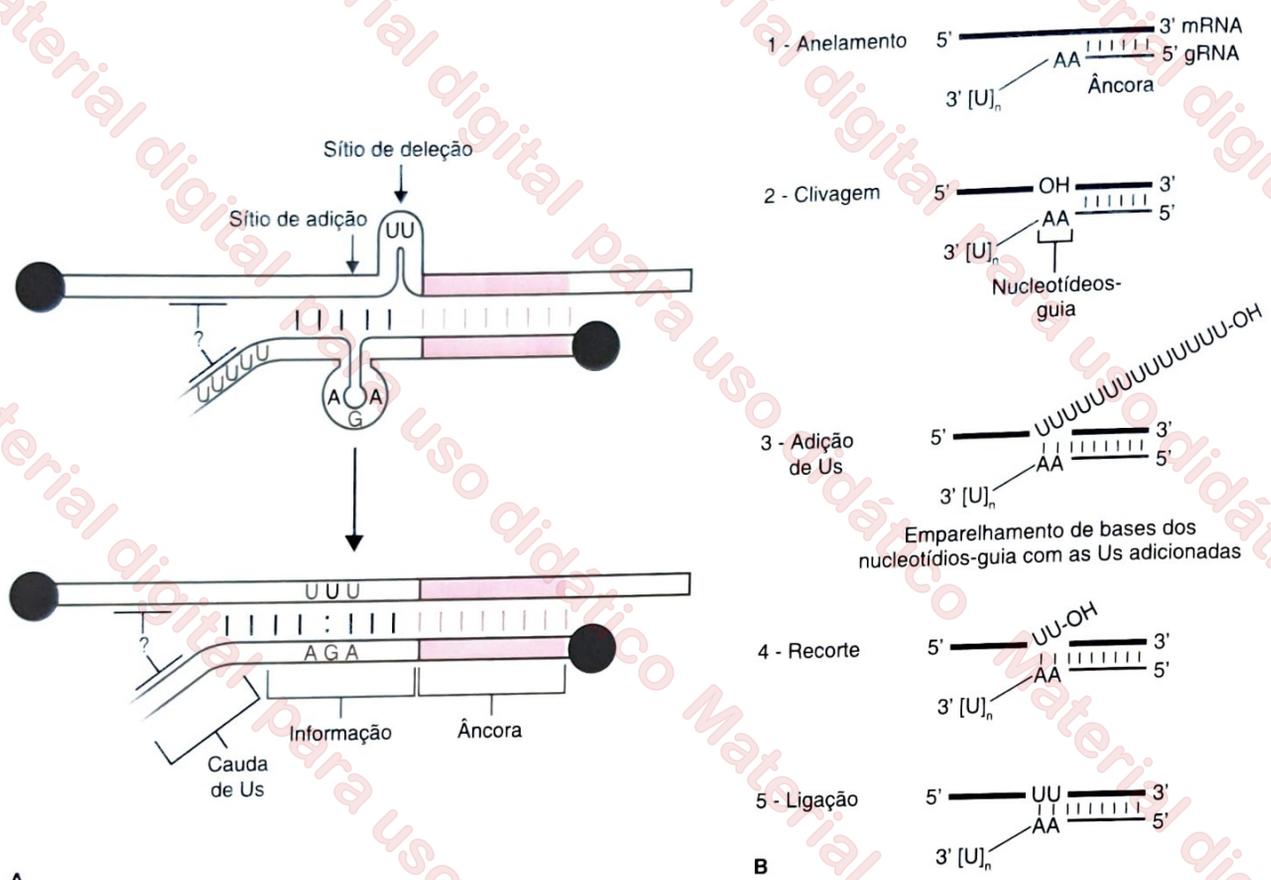


FIGURA 5.4 Esquematisação do processo de edição de RNA, que consiste na adição e/ou remoção sequencial de uridinas (U) nas cadeias de RNA recém-transcrito para a maturação do RNA mensageiro (mRNA) de modo que ele seja traduzido em uma proteína funcional. **A.** O pré-mRNA hibridiza-se por complementariedade de bases com RNA guias (gRNAs) que delimitam o sítio de edição. Duas situações são possíveis: 1) podem faltar Us no pré-mRNA; neste caso, o gRNA formará uma estrutura de tipo "haste-alça", sinalizando que nesse local devem ser adicionadas Us até preencher o espaço; 2) podem sobrar Us no pré-mRNA; neste caso, a "haste-alça" se formará no pré-mRNA, sinalizando que nesse local os nucleotídeos em excesso devem ser removidos. Note-se que as interações de tipo Watson e Crick não são sempre respeitadas; o que é corrigido é sempre o número de Us a serem adicionadas ou eliminadas do pré-mRNA. **B.** Edição passo a passo: (1) o gRNA e o pré-mRNA formam um híbrido no qual restam duas bases do gRNA não pareadas, formando-se um grampo no pré-mRNA; (2) o pré-mRNA é clivado, deixando um grupo -OH livre na região 5'; (3) uma uridil-terminal transferase adiciona algumas Us; (4) as Us restantes são removidas, ficando unidas ao mRNA em edição somente o número necessário para preencher o espaço; (5) forma-se a união fosfodiéster entre a extremidade 5' da última U adicionada e o restante do mRNA sendo editado.

glicose é processada até a formação de 3-fosfoglicerato; este é liberado no citosol, onde é convertido em piruvato. Além disso, o glicossomo parece desempenhar também um importante papel no metabolismo redox do parasito: contém as enzimas da via das pentoses-fostato, e é portanto uma das principais fontes de NADPH nessas células. Interessantemente, tal como acontece com os peroxissomos, os glicossomos são organelas permeáveis a metabólitos com uma massa molecular aproximada de até 400 Da. Como consequência disso, os glicossomos funcionam como compartimentos em relação a enzimas e cofatores tais como NAD⁺, NADP⁺, FAD e as suas correspondentes formas reduzidas, CoA e nucleotídeos, entre outros, mas não em relação aos metabólitos intermediários da maior parte das vias metabólicas que ocorrem neles (Figura 5.5).

Não há evidência de que *T. cruzi* armazene substâncias de reserva tais como carboidratos de alto peso molecular (glicogênio ou amido). Entretanto, os epimastigotas parecem armazenar energia sob a forma de proteínas e lipídios, em organelas denominadas *reservossomos*. O conteúdo proteico dessas organelas é degradado durante a diferenciação de epimastigotas

para tripomastigotas metacíclicos, no intestino do inseto vetor; portanto, os reservossomos são perdidos durante a metaciclogênese (Cunha-e-Silva et al., 2006). Não foram descritos reservossomos ou estruturas semelhantes em outros estágios do parasito.

Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. cruzi* é digenético, com um hospedeiro mamífero e um inseto. Em ambos os hospedeiros, observa-se alternância entre estágios reprodutivos que não são infectantes e estágios infectantes que não se reproduzem (Figura 5.6).

Os insetos vetores infectam-se quando fazem seu repasto sanguíneo sobre um mamífero infectado com formas tripomastigotas circulantes no sangue. Os tripomastigotas sanguíncolas são ingeridos e diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto. Nessa fase observam-se estágios de diferenciação transitórios, como os *esferomastigotas*, esféricos e morfológicamente semelhantes aos amastigotas. Os epimastigotas reproduzem-se por fissão binária e colonizam o intestino médio e posterior do inseto. Na porção distal do tubo

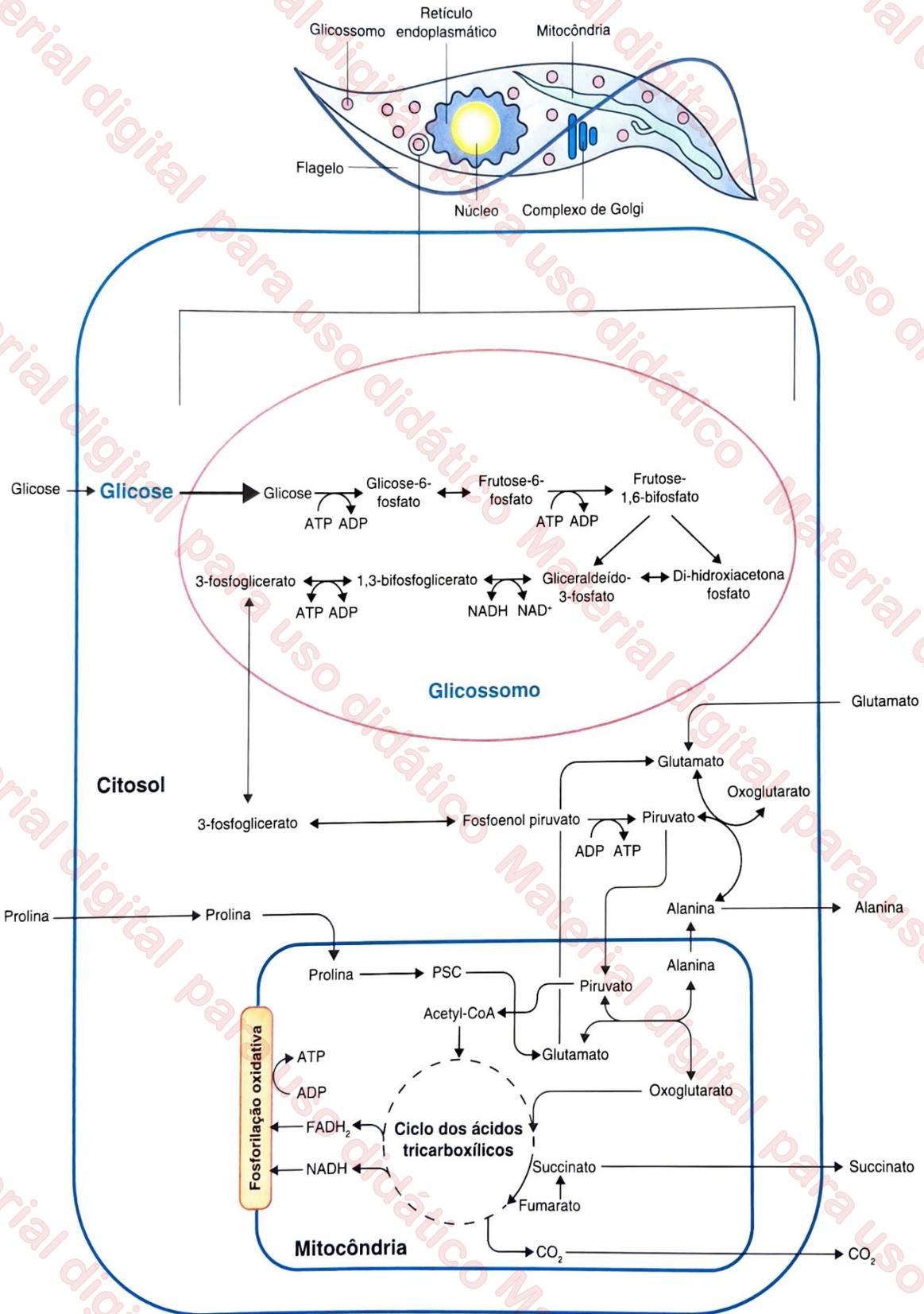


FIGURA 5.5 Esquemática da participação dos glicossomos na glicólise e outras vias metabólicas do parasito. A maioria das enzimas glicolíticas está compartimentalizada nessa organela, de tal forma que a glicose, para ser metabolizada, deve atravessar a membrana citoplasmática e a membrana glicossomal. A parte intraglicossomal da via glicolítica produz 3-fosfoglicerato, intermediário que pode difundir-se livremente para o citoplasma, onde ocorre o restante da glicólise. Eventualmente, o piruvato produzido pode ser translocado para o interior da mitocôndria, onde ou é completamente oxidado mediante o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a cadeia respiratória, ou é parcialmente oxidado mediante um processo de fermentação aeróbica da glicose.

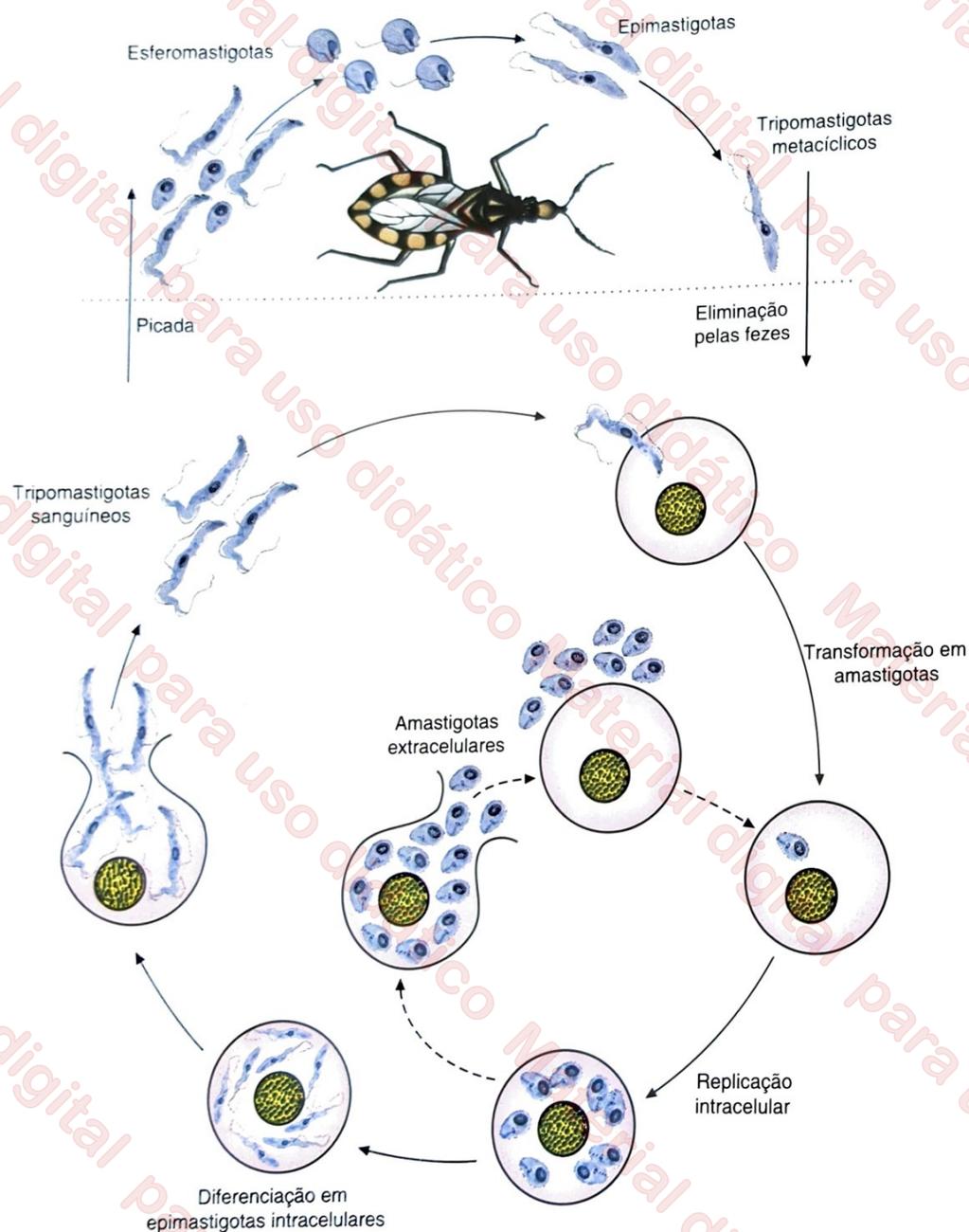


FIGURA 5.6 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. As setas tracejadas representam situações relativamente infrequentes em que amastigotas são encontrados no ambiente extracelular, em decorrência da ruptura prematura da célula infectada (antes da diferenciação dos amastigotas intracelulares em tripomastigotas sanguíneos). Os amastigotas podem eventualmente invadir células nas imediações do local onde foram liberados para prosseguir o ciclo intracelular em uma nova célula infectada.

digestório, os epimastigotas aderem-se às células epiteliais e inicia-se o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, infectantes. Os estímulos conhecidos para desencadear a diferenciação do parasito no tubo digestório do vetor, conhecida como *metaciclo gênese*, são a queda de pH para abaixo de 5,5 e o estresse metabólico. Quando os parasitos atingem o reto, encontram maior concentração de certos nutrientes que viabilizam, do ponto de vista energético, a etapa final da diferenciação. Os aminoácidos prolina, glutamato, aspartato e glutamina, assim como a glicose, são nutrientes que individualmente ou em conjunto são requeridos para a metaciclo gênese *in vitro*. Os tripomastigotas metacíclicos perdem a aderência ao epitélio

intestinal, sendo liberados no lúmen da porção distal do tubo digestório do vetor. Desta maneira, o parasito prepara-se para o encontro com o hospedeiro mamífero, no próximo repasto sanguíneo do vetor. O desenvolvimento completo dos parasitos em triatomíneos requer pelo menos 7 dias. Não há relatos na literatura de transmissão horizontal nem de cura em triatomíneos infectados (Guarneri; Lorenzo, 2017).

Os triatomíneos defecam durante – ou pouco tempo após – o repasto sanguíneo, depositando as fezes sobre a pele do mamífero do qual se alimentam. Nas fezes de triatomíneos infectados encontram-se tripomastigotas metacíclicos capazes de penetrar o novo hospedeiro por pequenas lesões ou

escarificações da pele ou pelas mucosas, mesmo íntegras. A cada evacuação, um triatomíneo infectado elimina em média 50 a 300 tripomastigotas metacíclicos. Ao encontrar células do hospedeiro mamífero, o parasito começa o complexo processo de invasão, que pode se dar essencialmente por duas vias: uma semelhante à fagocitose (predominante em células fagocíticas como macrófagos, por exemplo) e outra independente da fagocitose. Em ambos casos, a *invasão celular* depende de múltiplas interações bem coordenadas entre as células hospedeiras e o parasito (Figura 5.7). Do ponto de vista do parasito, o processo de invasão de células é ativo, dependente de energia, e envolve numerosas moléculas de adesão presentes em sua superfície. Ocorre troca de sinais moleculares, incluindo mobilização transitória de cálcio, que sinaliza para o recrutamento de lisossomos da célula hospedeira. Os lisossomos migram para as regiões da membrana plasmática onde há parasitos aderidos. Durante ou após a invaginação da membrana plasmática, há a fusão de lisossomos para formar o *vacúolo parasitóforo*, estrutura que aloja os tripomastigotas de maneira transitória (Barrias et al., 2013).

As condições ambientais do vacúolo parasitóforo, em especial o pH ácido, induzem o início do processo de diferenciação em amastigotas, que *escapam do vacúolo* para se estabelecerem

no citoplasma celular. Livres no citosol, os amastigotas começam a replicar-se por fissão binária. Portanto, a invasão das células hospedeiras parece ser um processo fundamental para a diferenciação do parasito em um estágio capaz de reproduzir-se. Calcula-se que cada tripomastigota que penetra em uma célula hospedeira originará até 500 amastigotas, e essa grande capacidade de multiplicação é um passo fundamental para o estabelecimento da infecção (Alves; Colli, 2007).

Depois de um número variável de divisões celulares, os parasitos voltam a diferenciar-se em tripomastigotas, passando por um estágio intermediário conhecido como *epimastigota intracelular*, com características morfológicas, bioquímicas e biológicas semelhantes ao epimastigota encontrado no vetor (Alves; Colli, 2007; Tyler; Engman, 2001). Alternativamente, os amastigotas podem espontaneamente adiar sua proliferação e entrar em um estado de *dormência*. Esses amastigotas dormentes podem despertar, reiniciando seu ciclo proliferativo normalmente, ou ainda diferenciar-se em tripomastigotas infectantes (Sánchez-Valdez et al., 2018). Os tripomastigotas rompem a membrana plasmática da célula hospedeira e são liberados no meio extracelular. Uma vez fora da célula hospedeira, os tripomastigotas podem invadir células vizinhas ou atingir a corrente sanguínea, disseminando-se para outros órgãos

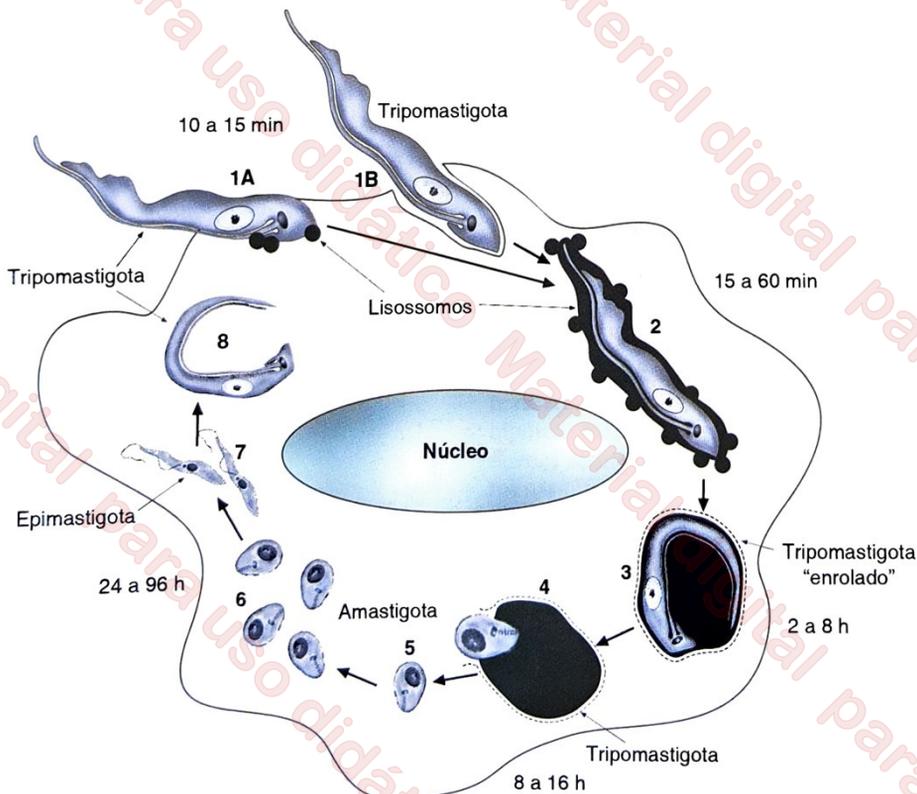


FIGURA 5.7 Mecanismos de invasão e sobrevivência intracelular de *Trypanosoma cruzi*. Em células não fagocitárias, o parasito interage com a superfície da célula hospedeira e estimula um intercâmbio de sinais moleculares que levam ao recrutamento e à fusão de lisossomos no local de adesão do parasito (1A). O parasito penetra ativamente; a fusão dos lisossomos com a membrana plasmática é a etapa inicial da formação do vacúolo parasitóforo, onde os tripomastigotas se alojam (2). Em células fagocitárias, o parasito é internalizado logo após a adesão à membrana da célula hospedeira (1B). Forma-se o fagossomo, ao qual posteriormente se fundem lisossomos (2). Em ambos os casos, o compartimento em que se aloja o parasito contém proteínas lisossômicas e pH ácido, que favorecem a lise da membrana vacuolar (3) e a liberação do parasito no citoplasma da célula hospedeira (4). No citosol, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas (5), que se multiplicam por fissão binária (6). Após um número variável de replicações, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas (8), passando transitivamente pelo estágio de epimastigota intracelular (7). Os tripomastigotas lisam a membrana citoplasmática e são liberados ao meio extracelular.

e tecidos. Ao fazer seu repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero com formas tripomastigotas sanguíneas, um vetor ingere esses estágios circulantes e se infecta. Ocasionalmente, a célula hospedeira rompe-se antes da diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas (ver Figura 5.6). Os amastigotas que chegam ao meio extracelular penetram em algumas células hospedeiras, especialmente células fagocitárias, mas provavelmente não atingem a corrente sanguínea (Bonfim-Melo et al., 2018).

Imunidade contra *Trypanosoma cruzi*

O parasito precisa sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo para aumentar as chances de encontro com o vetor (Boscardin et al., 2010). Deve, portanto, lidar com as respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro vertebrado, desencadeadas para controlar a infecção (Figura 5.8). Devido à dificuldade de acesso a casos clínicos durante a fase aguda da infecção, a resposta inata foi majoritariamente estudada em modelos de infecção experimental, com escassa validação dos dados da literatura em seres humanos. Quanto à resposta imune adquirida, existem mais dados que validam os dados experimentais em infecções humanas. Quanto aos mecanismos de imunidade inata, sabe-se que animais deficientes na via de sinalização através dos receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors* [TLR], na literatura de língua inglesa), quando infectados experimentalmente com *T. cruzi*, apresentam infecção

aguda mais grave. Várias moléculas do parasito, como glicosilinositolfolípidios (GIPLs), glicosilinositol (GPI) e seu próprio DNA, são capazes de ativar TLRs específicos, com participação na regulação das fases iniciais da infecção por *T. cruzi*. Em relação à resposta imune adquirida, sabe-se que tanto as células T CD4⁺ quando as CD8⁺ ($\alpha\beta$) são críticas no controle da infecção. Diferentes tentativas de desenvolvimento de vacinas têm mostrado que a resposta de tipo T_H1 geralmente contribui com a proteção, enquanto a resposta T_H2 contribui com a persistência do parasito, com maior gravidade da infecção. Também desempenham papel protetor na infecção experimental as células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT) e diversas citocinas, além de óxido nítrico produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Dados experimentais indicaram que a interferona gama (IFN)- γ e a interleucina (IL)-12 são componentes fundamentais da resposta imune protetora na infecção aguda e crônica. Embora a produção de IL-10 contribua para o controle da parasitemia, o excesso dessa citocina pode também resultar em agravamento da lesão tecidual. A resposta humoral também parece contribuir para o controle da evolução da doença; a transferência passiva de anticorpos, em infecções experimentais, controla a infecção, possivelmente por desencadear mecanismos efetores de citotoxicidade celular dependente de anticorpos.

Em pacientes, a resposta celular é crucial para controlar a fase crônica da infecção. Sabe-se que, quando os pacientes sofrem imunossupressão devido a uma coinfeção com HIV ou com medicamentos para evitar a rejeição de transplantes,

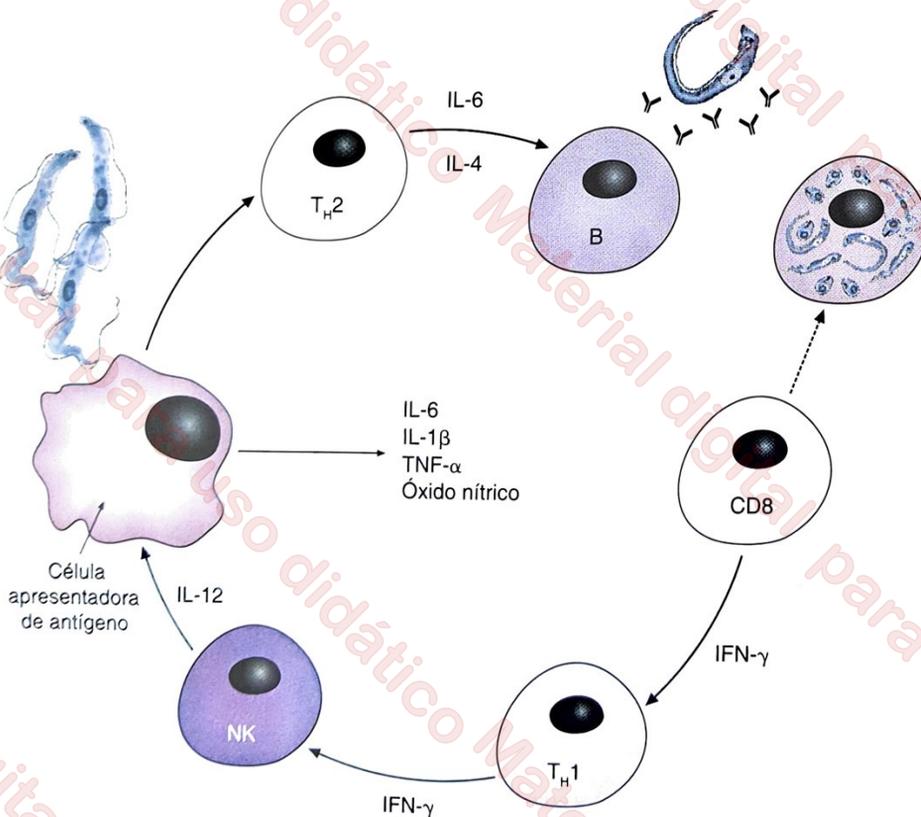


FIGURA 5.8 Resposta imune na infecção chagásica. As células apresentadoras de antígenos (APC) estão entre as primeiras a serem infectadas. Em resposta à infecção ocorre produção de citocinas como interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além da produção de óxido nítrico. IL-12 ativa as células *natural killer* (NK), ativando respostas de tipo T_H1, que estimulam a atividade citotóxica de células CD8⁺. Por sua vez, as células NK produzem interferona gama (IFN)- γ , uma resposta de tipo T_H2, com produção de altos níveis de IL-4 e IL-6, as quais estimulam a expansão de células B produtoras de anticorpos específicos contra o parasito.

a manifestação e gravidade dos sintomas associados à doença de Chagas aumenta significativamente. De fato, o papel da resposta imunológica do paciente na patologia é reforçado pelo encontro de células T CD4⁺ e CD8⁺ em biopsias de endomiocárdio em pacientes agudos e de células T CD8⁺ ativadas em pacientes crônicos com sintomatologia cardíaca.

Aspectos clínicos

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se no momento da infecção; caracteriza-se por parasitemia patente (*i. e.*, detectável por técnicas parasitológicas rotineiras) e pelos baixos títulos de anticorpos específicos de classe IgG, embora anticorpos IgM possam ser encontrados. A fase crônica inicia-se entre algumas semanas e uns poucos meses depois de adquirida a infecção, e caracteriza-se pela ausência de parasitemia patente e por uma intensa resposta imune humoral, com predomínio de anticorpos de tipo IgG (Figura 5.9).

A maior parte das infecções agudas é assintomática ou inaparente. O quadro clínico da *doença de Chagas aguda* tipicamente se instala nos primeiros dias ou meses após a infecção primária (geralmente entre 1 e 2 semanas após a transmissão vetorial) e dura entre 4 e 12 semanas, quando não há tratamento. Caracteriza-se por febre baixa e mal-estar acompanhados de linfadenopatia e de hepatoesplenomegalia. Quase sempre são encontrados sinais eletrocardiográficos sugestivos de miocardite, embora nem sempre acompanhados de expressão clínica. Podem ser observados sinais associados à porta de entrada do parasito, como o sinal de Romana (edema bilateral unilaterial com linfadenopatia satélite, que sugere penetração do parasito pela mucosa da conjuntiva) ou o chagoma de inoculação (lesão cutânea eritematosa e endurecida, porém indolor, que se desenvolve no sítio de penetração do

parasito). Em 1 a 5% dos casos decorrentes de transmissão vetorial, a fase aguda é grave; as complicações mais comuns, nesses casos, são a miocardite e a meningoencefalite. Sugere-se, entretanto, que as infecções adquiridas por via oral são mais frequentemente acompanhadas por miocardite grave, potencialmente levando ao óbito (Messenger et al., 2015).

A infecção crônica pode ser indeterminada ou sintomática. A *forma indeterminada* é aquela que se segue à fase aguda, aparente ou não, em que o indivíduo permanece assintomático. Cerca de 70% dos indivíduos cronicamente infectados têm a forma indeterminada, de duração variável, podendo estender-se por alguns meses ou muitos anos, até o fim da vida do paciente. Eventualmente, a forma indeterminada pode evoluir para *formas sintomáticas* ou *determinadas*, das quais as mais comuns são a cardíaca e a digestiva. Na forma cardíaca, que acomete cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados ao fim de décadas de seguimento, a manifestação clínica mais comum é a insuficiência cardíaca congestiva, acompanhada de alterações eletrocardiográficas típicas como o bloqueio completo do ramo direito e, frequentemente, o hemibloqueio anterior esquerdo. Em casos avançados, ocorre cardiomegalia. Arritmias complexas e morte súbita são relativamente comuns. Nas câmaras cardíacas (especialmente no ventrículo esquerdo) formam-se trombos que, ao se desprenderem, causam embolia sistêmica grave, como o acidente vascular cerebral isquêmico, a uma taxa de 2,7 eventos a cada 100 pacientes seguidos por 1 ano. Estima-se que, entre indivíduos na fase crônica indeterminada, a taxa de progressão para a miocardiopatia seja de 1,8% ao ano (Sabino et al., 2013). Na forma digestiva, que acomete 10 a 21% dos indivíduos infectados cronicamente, a destruição dos plexos nervosos ao longo do trato digestório produz alterações funcionais e morfológicas principalmente no esôfago, no cólon ou ambos. As manifestações clínicas mais comuns são aquelas associadas ao megaesôfago (disfagia, regurgitação, dor epigástrica) e o megacólon (constipação intestinal crônica, distensão abdominal). As formas digestivas da doença de Chagas são menos comuns que as forma cardíacas, e são encontradas em geral na Argentina, na Bolívia, no Brasil, no Chile, no Paraguai e no Uruguai, mas não no norte da América do Sul, na América Central e no México. Uma hipótese para explicar as diferenças de expressão clínica da doença seria o predomínio de diferentes linhagens de parasitos nas infecções adquiridas em cada região (Messenger et al., 2015; Zingales, 2018). Podem ocorrer *formas mistas* em que se associam sintomas cardíacos e digestivos, as quais representam 5 a 20% dos casos com miocardiopatia.

Finalmente, em pacientes imunocomprometidos, uma infecção chagásica crônica pode reativar-se; isto ocorre, por exemplo, em 20% dos pacientes com coinfeção pelo HIV. A forma mais comum de comprometimento cerebral é a meningoencefalite (75 a 90% dos casos), que tem a neurotoxoplasmose como um importante diagnóstico diferencial; abscessos cerebrais também são relatados. A segunda forma clínica mais comum na reativação da doença de Chagas é a miocardite aguda (10 a 55% dos casos), algumas vezes sobreposta a uma miocardiopatia crônica preexistente. A letalidade chega a 20%. Pacientes com miocardiopatia chagásica grave são candidatos a um transplante cardíaco, seguido de imunossupressão. Nesse contexto, a reativação da infecção é uma complicação comum (que ocorre em 20 a 50% dos pacientes), mas raramente leva à morte. Taxas mais baixas de reativação são relatadas após o transplante renal (8 a 37%) e de medula óssea (27%) (Pérez-Molina; Molina, 2018).

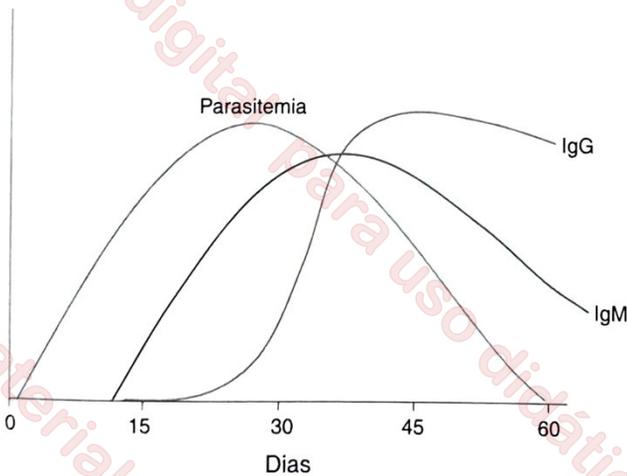


FIGURA 5.9 Evolução da parasitemia e da resposta imune humoral nas diferentes fases da infecção. A fase aguda inicia-se no momento da infecção e pode durar até alguns meses. Caracteriza-se por uma parasitemia evidente, e, no início, ausência total de anticorpos. Entre 2 e 4 semanas após o início da infecção, observam-se anticorpos IgM específicos. A parasitemia declina a partir de 40 a 60 dias após a infecção. Na fase crônica, a parasitemia não é mais evidente; cai a concentração de anticorpos IgM, mantendo-se títulos elevados de anticorpos IgG.

Quando há manifestações clínicas da doença em indivíduos imunocompetentes, em geral se observam infiltrados inflamatórios nos tecidos afetados, mas a carga parasitária em tecidos cronicamente infectados é muito baixa. Esses achados serviram de base para a hipótese de que as lesões teciduais que produzem manifestações clínicas da doença de Chagas se devem essencialmente a uma resposta autoimune contra células do hospedeiro, desencadeada originalmente pela presença do parasito. Descreeveram-se diversos anticorpos e linhagens celulares que reconhecem cruzadamente antígenos do parasito e de hospedeiros experimentais e do ser humano, sugerindo a ocorrência de mimetismo molecular; no entanto, a hipótese autoimune não explica, por si só, a natureza multifocal da miocardite nem a localização preferencial das lesões no ápice do ventrículo. Por outro lado, há um grande acúmulo de evidências que mostram uma relação direta entre a carga parasitária inicial e a gravidade das lesões teciduais observadas na fase crônica em modelos experimentais, dados que indicam uma participação direta do parasito na patologia (Tarleton, 2001).

Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

A Tabela 5.1 resume os principais métodos utilizados para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. O *diagnóstico parasitológico* direto baseia-se no encontro de tripomastigotas em amostras de sangue capilar ou venoso, e é particularmente útil na fase aguda da infecção. Em preparações não fixadas, pode-se observar batimento flagelar do parasito com uma coloração vital simples, usando-se azul de metileno (Figura 5.10). Na fase crônica, utilizam-se mais frequentemente os *métodos diagnósticos indiretos*, orientados a identificar componentes da resposta imune específica contra o parasito.

A sensibilidade do exame microscópico de preparações a fresco, esfregaços e gotas espessas varia, na fase aguda, entre 50 e 90%, dependendo dos níveis de parasitemia e da experiência do microscopista que examina a preparação. O exame de sangue centrifugado em tubos de micro-hematócrito resulta em maior sensibilidade, pois os parasitos presentes na amostra são concentrados na interface entre o plasma e as hemácias, logo acima do creme leucocitário. Outra técnica de concentração é a de Strout, que consiste na centrifugação de amostras de soro de pacientes e pesquisa de tripomastigotas no sedimento. Em casos de dúvida diagnóstica, outras metodologias complementares deverão ser utilizadas. A pesquisa de anticorpos IgM específicos e o uso de técnicas de amplificação por cultura das amostras sendo analisadas (xenodiagnóstico e hemocultura) podem ser úteis, mas a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgG é raramente positiva.

O *xenodiagnóstico* consiste na alimentação de ninfas de triatomíneos livres de infecção com o sangue de pacientes. Os parasitos, se presentes, multiplicam-se no tubo digestório do vetor. As fezes das ninfas utilizadas no exame são examinadas 30, 60 e 120 dias após o repasto sanguíneo. Pode ser feito o chamado *xenodiagnóstico natural*, originalmente descrito por Émile Brumpt, em 1914, que consiste na alimentação de ninfas aplicadas diretamente sobre a pele dos pacientes (Figura 5.11A), ou o *xenodiagnóstico artificial*, em que as ninfas são alimentadas através de membranas com sangue do paciente coletado com anticoagulante. A hemocultura baseia-se

TABELA 5.1 Métodos laboratoriais para o diagnóstico da doença de Chagas.

Fase aguda ou infecção congênita

- Microscopia: detecção de tripomastigotas sanguíneos em exame a fresco em lâmina (pode-se usar coloração vital com azul de metileno), em gota espessa ou esfregaço corado com Giemsa ou Leishman, ou após centrifugação em tubos de micro-hematócrito. A técnica de Strout (centrifugação de amostras de soro) também é utilizada
- Sorologia: níveis elevados de anticorpos IgM, na reação de imunofluorescência indireta ou ELISA, sugerem infecção recente, mas a sensibilidade é relativamente baixa. Isoladamente, não é possível fechar o diagnóstico
- Xenodiagnóstico e hemocultura: podem detectar baixas parasitemias, mas a leitura dos resultados só é feita depois de pelo menos 30 dias
- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros métodos moleculares: podem detectar e quantificar o DNA do parasito no sangue com alta sensibilidade. Possibilitam também determinar o genótipo do parasito, uma informação potencialmente útil para a definição de prognóstico.

Fase crônica

- Sorologia: níveis elevados de anticorpos IgG, na reação de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta ou ELISA indicam infecção crônica. Resultados discordantes entre diferentes métodos ocorrem em 3% dos casos
- Xenodiagnóstico e hemocultura: têm sensibilidade relativamente baixa, mas podem ser úteis na confirmação diagnóstica
- Reação em cadeia da polimerase (PCR) e outros métodos moleculares: podem detectar DNA do parasito no sangue ou em tecidos com razoável sensibilidade (50 a 90%), mas não são amplamente disponíveis em áreas endêmicas. Os testes quantitativos possibilitam avaliar se houve redução na carga parasitária após o tratamento.



FIGURA 5.10 Tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* corados com azul de metileno. Fotografia de Cláudio Santos Ferreira.

no mesmo princípio: os parasitos eventualmente presentes no sangue periférico dos pacientes podem ser encontrados com maior facilidade após uma etapa de multiplicação de epimastigotas em cultura *in vitro*. As leituras são quase sempre feitas 30, 60, 120 e 180 dias após a sementeira. O meio de cultura mais utilizado é o *liver infusion tryptose* (LIT), ainda que várias alternativas estejam disponíveis. A principal desvantagem dessas técnicas parasitológicas no diagnóstico da doença de

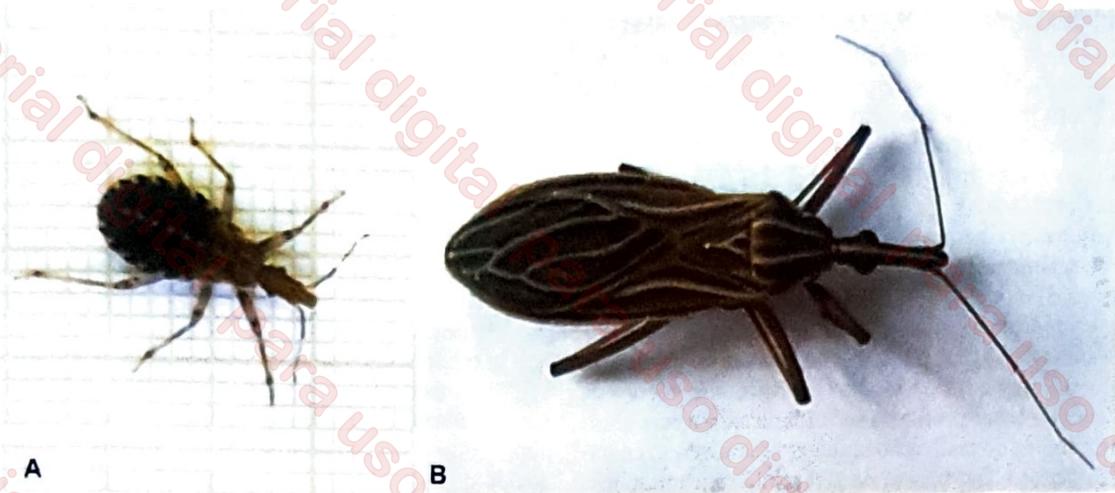


FIGURA 5.11 Triatomíneos. A. Ninfa de *Triatoma infestans*. As ninfas, assim como os adultos, são hematófagas e permitem a replicação do parasito em seu tubo digestivo. Por isso, são frequentemente usadas para o xenodiagnóstico. Fotografia de Cláudio Santos Ferreira. B. Exemplar adulto de *Rhodnius brethesi*, importante vetor silvestre de *Trypanosoma cruzi* na Amazônia brasileira. Fotografia de Marcelo Urbano Ferreira.

Chagas aguda reside no tempo necessário para a obtenção de resultados, ainda que a sensibilidade seja próxima a 100%.

Na fase crônica, as parasitemias são baixas e intermitentes. Por isso, as técnicas de cultura de parasitos de amostras clínicas têm sensibilidade variável: entre 13 e 59% para o xenodiagnóstico natural e entre 22 e 79% para a hemocultura, dependendo de diversas variáveis experimentais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilita a detecção de parasitos no sangue e tecidos de pacientes, com razoável sensibilidade mesmo na fase crônica (50 a 90%). É frequentemente utilizada em contexto de pesquisa, mas ainda não se tornou amplamente disponível em laboratórios de rotina. Os testes moleculares quantitativos, como a PCR em tempo real, produzem estimativas de carga parasitária úteis no seguimento de pacientes tratados.

Diversas modalidades de diagnóstico sorológico podem ser empregadas na fase crônica, com importante papel também na triagem de doadores de sangue. Para o diagnóstico de infecção congênita, a detecção de anticorpos IgG específicos na criança tem baixo valor preditivo positivo até os 8 a 9 meses de idade, em função da transferência transplacentária de anticorpos maternos. A reação de fixação de complemento foi a primeira técnica indireta de diagnóstico, originalmente descrita por Guerreiro e Machado, em 1913. Deixou de ser recomendada pelo Ministério da Saúde para uso rotineiro, em 1996, devido às grandes dificuldades na sua padronização. As técnicas atualmente mais utilizadas para a detecção de anticorpos são a reação de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e imunoenensaio enzimático (ELISA); existem também métodos baseados em quimioluminescência. Há um grande número de antígenos recombinantes atualmente disponíveis para captura de anticorpos específicos em testes de tipo ELISA, mas os ensaios clássicos com extratos proteicos purificados de parasitos ainda são amplamente utilizados (Balouz et al., 2017). Existem no comércio diversos testes imunocromatográficos qualitativos para a detecção de anticorpos contra *T. cruzi* em amostras de soro, plasma ou sangue total, que produzem resultados em 15 min. Um exemplo é o teste SD Bioline Chagas AB, produzido pela Abbott, com formato semelhante a um teste de gravidez convencional (Sánchez-Camargo et al., 2014). No entanto, esses produtos ainda não se tornaram amplamente utilizados, especialmente em função do custo relativamente elevado.

Tratamento da doença de Chagas

Na fase aguda da infecção, o tratamento é feito com *benznidazol*, também conhecido como *benzonidazol*, produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e distribuído para todo o Brasil e outros países da América Latina. Utilizam-se 5 a 10 mg/kg/dia divididos em duas ou três doses ao longo de 60 dias. O *nifurtimox*, que pode ser utilizado na dose de 8 a 10 mg/kg/dia (adultos) ou 15 mg/kg/dia (crianças) por 60 a 90 dias, encontra-se atualmente fora do mercado nacional. Na fase aguda, estima-se que o tratamento com benznidazol seja eficaz em 80 a 100% dos pacientes. As infecções congênitas são tratadas com benznidazol (10 mg/kg/dia durante 60 dias) ou nifurtimox (15 mg/kg/dia durante 60 dias), com eficácia semelhante à do tratamento da infecção aguda. Os efeitos colaterais mais comuns do benznidazol, especialmente em pacientes na fase crônica, são distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), lesões cutâneas (como prurido e exantema) e neuropatia periférica; cerca de 30% dos indivíduos tratados apresentam alguma reação adversa.

Os medicamentos disponíveis são relativamente pouco eficientes contra estágios intracelulares do parasito. Isso foi atribuído, recentemente, ao fato já mencionado de os amastigotas intracelulares poderem permanecer durante longos períodos de tempo como formas “dormentes” (Sánchez-Vadéz et al., 2018), com redução de sua atividade metabólica e replicativa. Portanto, o tratamento etiológico da doença de Chagas crônica é ainda assunto controverso. Recomenda-se o tratamento de todas as infecções recentes, diagnosticadas em crianças e adolescentes soropositivos com idade inferior a 18 anos (Andrade et al., 1996). Nesse contexto, a eficácia do tratamento é estimada em 60%. As formas indeterminadas e clínicas incipientes também podem ser tratadas com benznidazol, embora não haja consenso a esse respeito. Um estudo multicêntrico comparou recentemente as taxas de cura e piora da doença cardíaca em indivíduos com miocardiopatia chagásica tratados com benznidazol (5 mg/kg/dia durante 60 dias) ou placebo. Ao fim de 5 anos de seguimento, 47% dos indivíduos tratados e 33% dos indivíduos não tratados, que receberam placebo, tinham resultados de PCR diagnóstica negativos;

entretanto, proporções semelhantes de indivíduos tratados e controles (27% vs. 29%) tiveram uma deterioração grave da função cardíaca ao longo do seguimento (Morillo et al., 2015). Na maioria dos pacientes com formas determinadas, o tratamento geralmente limita-se ao controle das complicações tardias, cardíacas e digestivas (Bocchi et al., 2017; Pinazo et al., 2010). Uma exceção deve ser notada: recomenda-se, em muitos países, que as mulheres em idade fértil portadoras de infecção crônica sejam tratadas com benznidazol (5 a 8 mg/kg/dia durante 60 dias) ou nifurtimox (8 a 10 mg/kg/dia durante 60 a 90 dias) para reduzir o risco de transmissão congênita (Pérez-Molina; Molina, 2018). Os pacientes portadores de coinfeção pelo HIV e *T. cruzi* que apresentem reativação da doença de Chagas devem receber profilaxia secundária após a cura clínica e parasitológica da reativação enquanto mantiverem contagens de linfócitos CD4⁺ abaixo de 200 células por microlitro. A profilaxia é feita com 2,5 a 5 mg/kg/dia de benznidazol três vezes/semana.

Alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos

Os dois fármacos atualmente aprovados para o tratamento da doença de Chagas foram descobertos aproximadamente meio século atrás, e, como mencionado, são insatisfatórios. A descoberta de alvos metabólicos para desenvolver medicamentos com ação tripanocida é uma prioridade de pesquisa e desenvolvimento (Dushak, 2016). Descrevem-se aqui alguns resultados de pesquisa recente nesse campo.

As *cisteína-proteases* participam em vários processos celulares fundamentais no ciclo de vida de *T. cruzi*, como o metabolismo energético, a diferenciação, a invasão da célula hospedeira e a evasão do sistema imune. O membro mais abundante da família das cisteína-proteases de *T. cruzi* é a *cruzipaina*, também denominada *cruzaína*. Por ser uma enzima com características bioquímicas diferentes das proteases do hospedeiro, a cruzipaina é considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de inibidores específicos. O uso de inibidores sintéticos destas enzimas, como dipeptídeos derivatizados com sulfona, ou análogos de 8-cloro-N-(3-morfolinopropil)-5 H-pirimido [5,4-b]indol-4-amina, tem mostrado resultados promissores no tratamento da infecção experimental por *T. cruzi*.

A *via de síntese de esteróis* também fornece alvos promissores, uma vez que o principal esteroide nas membranas de *T. cruzi* é o ergosterol, e não o colesterol, presente nas células dos hospedeiros mamíferos. Portanto, a busca de inibidores específicos de enzimas dessa via apresenta boas perspectivas em termos de obtenção de fármacos com toxicidade seletiva.

A inibição de enzimas da *via de síntese de poli-isoprenoides*, utilizando bisfosfonatos, reduz a parasitemia em infecções experimentais em camundongos. Os bisfosfonatos acumulam-se nos acidocalcissomos (organelas que armazenam Ca²⁺ e polifosfatos), indicando que estes poderiam ser também alvos desses compostos.

O *metabolismo redox* dos tripanossomatídeos apresenta, entre outras, a peculiaridade de basear-se na produção de tripanotona, uma tiol-poliamina conjugada presente exclusivamente em *T. cruzi*, em vez de glutatona. Uma enzima-chave no metabolismo de tripanotona em *T. cruzi* é a tripanotona redutase, ausente no hospedeiro mamífero, um potencial alvo para o desenvolvimento de medicamentos.

Várias particularidades identificadas no metabolismo de aminoácidos em *T. cruzi* estão sendo exploradas para o desenvolvimento de novos medicamentos, como as enzimas de tipo arginina quinase e prolina racemase, ausentes no hospedeiro mamífero. Como os tripanossomatídeos são parasitos auxotróficos para purinas, as *vias de salvação de purinas e de biossíntese de nucleotídeos* compreendem candidatos naturais a alvos para novos medicamentos. Dentre essas enzimas, a (hipoxantina/guanina)-fosforribosil transferase mostrou ser alvo particularmente interessante. De fato, o alopurinol, que inibe essa enzima, foi proposto para o tratamento de reativações da infecção por *T. cruzi* após transplante cardíaco.

A *superóxido dismutase dependente de ferro* (Fe-SOD, do inglês *Fe-superoxide dismutase*) catalisa a transferência do ânion superóxido por meio de sua dismutação para oxigênio ou peróxido de hidrogênio. É uma enzima-chave na resistência do parasito ao desbalanço redox que enfrenta em alguns ambientes oxidantes. *Tripanossoma cruzi* apresenta quatro isoformas da Fe-SOD, uma mitocondrial, uma citosólica e duas glicosomais. Todas elas são diferentes de seus correspondentes em mamíferos, e são, portanto, excelentes alvos para o desenho de inibidores com atividade seletiva contra os tripanossomos.

A maquinaria de replicação do DNA do parasito também fornece algumas peculiaridades e foram exploradas como alvos para a inibição seletiva. Inibidores da topoisomerase I, envolvida na replicação do DNA nuclear, e particularmente da topoisomerase II, envolvida na replicação do kDNA, mostraram-se eficazes contra *T. cruzi*. O próprio DNA do parasito também foi proposto como alvo de intercalantes e ligantes de DNA com atividade tripanocida.

Finalmente, as nitrorredutases são enzimas presentes em muitos microrganismos procaríotes e eucariotes que catalisam processos redutivos em compostos nitrogenados. Essas enzimas podem reduzir compostos nitro-heterocíclicos de baixa toxicidade a compostos de alta toxicidade, como acontece com o nifurtimox. O desenho de compostos de baixa toxicidade que essas enzimas podem converter em fármacos altamente tóxicos (pró-drogas) no local de ação (dentro do parasito) abre perspectivas para o desenho racional de fármacos altamente específicos contra *T. cruzi*. Porém, deve-se ressaltar que os dados obtidos até agora mostram que as nitrorredutases por si sós não são um alvo terapêutico, pois a sua inibição não compromete de forma significativa a viabilidade do parasito durante a infecção.

Vetores da doença de Chagas

Os insetos adultos recebem, em diferentes regiões do Brasil, os nomes de barbeiro, bicho-da-parede, bicudo, chupão, chupança e vários outros. Os hemípteros são geralmente muito semelhantes entre si. Entretanto, algumas características morfológicas simples distinguem os triatomíneos dos hemípteros predadores e fitófagos, que não são vetores de doenças humanas. As diferenças mais evidentes estão na probóscida (Figura 5.12).

A probóscida dos *triatomíneos*, adaptada à sucção de sangue, é curta (composta de três segmentos) e reta. Quando em repouso, ela não ultrapassa para trás a inserção do primeiro par de patas do inseto (Figura 5.13). Os *predadores* também apresentam probóscida curta, porém curva. Além disso, geralmente têm o primeiro par de patas mais forte e desenvolvido



FIGURA 5.12 Características morfológicas de hemípteros hematófagos, predadores e fitófagos. No painel superior representa-se o corpo de hemípteros com diferentes hábitos alimentares: hematófago (A), predador (B) e fitófago (C). Os predadores têm pernas anteriores mais robustas e um pescoço facilmente identificável, que serve para manipular as presas. Nos fitófagos, a cabeça é pequena e o pescoço não é visível. Nos hematófagos, a cabeça é alongada e o pescoço é evidente. No painel do meio, apresentam-se as características do aparelho bucal ou probóscida desses três grupos de hemípteros. Nos hematófagos (D) e predadores (E), a probóscida é longa (em repouso, ultrapassa o primeiro par de patas), com quatro segmentos, e reta. O painel inferior mostra a diferença no nível de implantação das antenas em hemípteros hematófagos (triatomíneos) pertencentes aos três gêneros de importância médica: *Triatoma* (G), *Rhodnius* (H) e *Panstrongylus* (I). Observe que, em *Rhodnius*, cuja cabeça é alongada, os tubérculos em que se implantam as antenas localizam-se bem distante dos olhos, junto à extremidade conhecida como clipeo; em *Panstrongylus*, cuja cabeça é curta, os tubérculos situam-se junto aos olhos; em *Triatoma*, os tubérculos são distantes dos olhos, mas não tanto como em *Rhodnius*.

do que os demais. A probóscida dos fitófagos é longa, composta de quatro segmentos; quando em repouso, ultrapassa para trás a inserção do primeiro par de patas do inseto. Além disso, os fitófagos geralmente não têm pescoço visível, como os demais hemípteros reduvídeos.

Todos os triatomíneos são potenciais vetores da doença de Chagas. Dentre as 140 espécies descritas, existem aquelas de hábitos domiciliares, domésticos e peridomiciliares, que são as responsáveis por fazer a interligação entre o ciclo silvestre e o ciclo domiciliar na transmissão. Vem ocorrendo domiciliação progressiva de certas espécies de triatomíneos, o que pode mudar o padrão de transmissão da doença.

No Brasil, as espécies vetoras atualmente mais importantes são *P. megistus*, principalmente na faixa litorânea, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* no Nordeste e *T. sordida* no interior do país. *Triatoma infestans*, historicamente o principal vetor da infecção em boa parte do território nacional e no Cone Sul da América do Sul, tornou-se raro no país em função dos programas de controle dessa espécie, mas é ainda o principal vetor na Bolívia e no sul do Peru. Algumas espécies encontradas no domicílio e no peridomicílio humanos têm importância secundária, como *T. rubrovaria* no Rio Grande do Sul, *R. neglectus* em Goiás e *P. nasutus* no Ceará e no Rio Grande do Norte, bem como aquelas com elevada prevalência de infecção natural,



FIGURA 5.13 Probóscida de *Triatoma infestans*, adaptada à sucção de sangue. Observe que a probóscida é composta de três segmentos e reta. Na posição de repouso, sua extremidade distal não ultrapassa para trás a inserção do primeiro par de patas do inseto. Fotografia de Cláudio Santos Ferreira.

como *T. vitticeps* no Rio de Janeiro e no Espírito Santo e *P. lutzi* no Ceará e em Pernambuco. No norte da América do Sul e em diversos países da América Central, *R. prolixus* é o principal vetor da doença de Chagas; no Brasil, é encontrado no extremo norte do país. A diferenciação entre os três gêneros principais pode ser feita com facilidade, comparando-se a posição da inserção da antena em relação aos olhos do inseto. Em *Panstrongylus*, o tubérculo em que a antena é implantada localiza-se junto aos seus olhos, enquanto em *Rhodnius* a antena é inserida na extremidade anterior do clipeo, longe dos olhos. No gênero *Triatoma*, as antenas inserem-se em posição intermediária entre os olhos e o clipeo (ver Figura 5.12).

Triatoma infestans é o principal vetor de *T. cruzi* em grande parte da América do Sul. É uma espécie bem adaptada ao domicílio humano, encontrada particularmente nas frestas das paredes de casas não rebocadas. Os adultos são capazes de voar, mas não atingem grande distância. Em casas infestadas, geralmente são encontradas grandes quantidades de ovos, ninfas e adultos; como as ninfas e os adultos são suscetíveis à ação de diversos inseticidas, a borrifação dos domicílios com inseticidas de ação residual tem grande impacto sobre a população de vetores. *T. brasiliensis* é um importante vetor primário da doença de Chagas no sertão nordestino, onde é frequentemente o único triatomíneo encontrado no interior dos domicílios humanos. *Panstrongylus megistus* apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil, e é o principal (e às vezes o único) vetor da doença de Chagas em certas áreas endêmicas, especialmente na Bahia e em Minas Gerais. No entanto, é uma espécie pouco domiciliada no Sudeste e no Sul do país, onde não parece desempenhar um papel importante no ciclo doméstico da doença de Chagas. É possível, portanto, que exista um complexo de espécies com comportamento distinto reunidas sob o nome comum de *P. megistus*.

Desde o final da década de 1960 são relatados casos autóctones de doença de Chagas na Amazônia brasileira. Dez espécies de triatomíneos amazônicos foram encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi*. Dessas, algumas espécies do gênero *Rhodnius* (5.11B), como *R. pictipes*, *R. brethesi*, *R. robustus* e *R. prolixus*, são os principais vetores locais; *T. maculata* e *P. geniculatus* são também encontrados (Coura et al.,

2002). Atualmente, a quase totalidade dos casos de doença de Chagas aguda por transmissão vetorial relatados no Brasil ocorre na Amazônia. Uma importante característica da maioria dos vetores locais, com a exceção de *T. maculata* e *R. prolixus*, é sua incapacidade de colonizar as moradias humanas. Os triatomíneos mantêm-se como insetos silvestres, frequentemente abrigados em palmeiras, que esporadicamente adentram os domicílios humanos em busca de sangue, mas logo retornam ao meio externo. São comumente atraídos pela luz das moradias humanas. Algumas atividades econômicas, como a coleta de piaçaba ou piaçava (fibra de palmeira utilizada na fabricação de vassouras e peças de artesanato, além da cobertura das casas) por populações ribeirinhas do alto e médio Rio Negro, estão associadas ao risco de contato com triatomíneos, especialmente *R. brethesi*, e consequente infecção. Além da transmissão vetorial, ocorrem na Amazônia surtos frequentes de doença de Chagas aguda de aquisição por via oral, associados ao consumo de açaí e outros frutos regionais contaminados com o conteúdo do trato digestório de barbeiros. A prevalência de anticorpos contra *T. cruzi* nessas comunidades chega a 5%.

Prevenção e controle da doença de Chagas

A transmissão vetorial da doença de Chagas é tipicamente rural. Os principais vetores adaptaram-se ao domicílio humano, especialmente ao abrigo proporcionado por fendas nas paredes de casas de construção precária, de pau a pique e barro, e seus telhados de palha. Com a maciça migração para as áreas urbanas ao longo das últimas décadas, chegou às cidades latino-americanas um grande contingente de pacientes portadores das formas crônicas de infecção. O mesmo ocorre nas grandes cidades europeias e norte-americanas que recebem muitos migrantes latino-americanos. Nos EUA, estima-se haver 300.000 indivíduos com infecção chagásica crônica; cerca de 4% dos migrantes latino-americanos que vivem na Europa estão infectados.

Entre 1991 e 2010, estima-se que a prevalência global da infecção chagásica tenha sido reduzida em mais de três vezes, de 18 milhões para 5,7 milhões de portadores do parasito. No Brasil, existem entre 1,5 e 3,5 milhões de indivíduos infectados. Cerca de 70 milhões de indivíduos estão expostos ao risco de transmissão vetorial em 21 países das Américas, desde o sul dos EUA até o norte da Argentina e Chile. A principal área de transmissão é o Chaco boliviano, com 0,1 a 4% de incidência anual. Estima-se o impacto global da doença de Chagas em cerca de 800.000 anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY, do inglês *disability-adjusted life-years*); no mundo ocidental, essa estimativa é mais de sete vezes superior à da malária. Aproximadamente 37.000 pessoas são infectadas, e 12.000 pessoas morrem de doença de Chagas a cada ano em todo o mundo (Pérez-Molina; Molina, 2018).

O reservatório animal de *T. cruzi* compreende mais de 100 espécies, incluindo marsupiais, morcegos, diversos carnívoros e roedores, tatus e bichos-preguiça e numerosos primatas não humanos. Cães, gatos e ratos domésticos são um importante elo entre o ciclo silvestre e o ciclo doméstico do parasito.

Embora a principal via de transmissão da doença de Chagas seja a vetorial, a infecção pode ser adquirida por vias alternativas, que exigem medidas preventivas específicas. Acredita-se que a *transmissão oral* tenha maior relevância epidemiológica do que se suspeitava até recentemente, com cerca de 100 casos anuais no Brasil, especialmente na Amazônia (Shikanai-Yasuda; Carvalho, 2012); estima-se que 69% dos novos casos no país sejam contraídos por via oral, 9% por via vetorial e 21% por via não identificada. Os principais veículos de transmissão oral descritos são a polpa e o suco de açaí, pataúá, buriti, bacaba e de outras palmeiras amazônicas, contaminados com fezes de triatomíneos infectados durante seu preparo. Há também exemplos de surtos associados ao consumo de caldo de cana e suco de goiaba acidentalmente contaminados com parasitos provenientes de triatomíneos. Ocasionalmente trituram-se triatomíneos infectados junto com a cana durante o preparo do caldo, originando a contaminação. O período de incubação varia entre 3 e 22 dias, com mortalidade na fase aguda entre 1 e 35%. Na natureza, a ingestão de triatomíneos contaminados é, muito provavelmente, a principal forma de infecção do vasto reservatório silvestre da infecção. Outras fontes mais raras de transmissão oral em seres humanos são a ingestão de carne de caça, crua ou malcozida, de animais contaminados e o aleitamento materno. A *transmissão transfusional* é extremamente importante em regiões com grande número de doadores de sangue provenientes de áreas endêmicas. A probabilidade de infecção a partir da transfusão de uma bolsa de sangue infectado situa-se em torno de 10 a 20%, dependendo de fatores como a parasitemia do doador e o tipo de hemoderivado transfundido. Na triagem de doadores de sangue, excluem-se os candidatos com sorologia positiva (com base em imunoenensaio enzimático de alta sensibilidade), bem como os candidatos com diagnóstico clínico ou sorológico prévio de infecção, ainda que se mantenham assintomáticos ou tenham sido tratados, e aqueles que, durante a entrevista, informem ter contato com o vetor em seu domicílio. Finalmente, a doença de Chagas pode também ser adquirida por *via transplacentária* (congenita), bem como em *acidentes de laboratório* ou *transplante de órgãos*. A frequência de transmissão congênita é extremamente variável; cerca de 1 a 18% (média de 5%) dos filhos de mães cronicamente infectadas apresentam infecção congênita em diferentes regiões da América Latina. Estima-se que 8.600 casos de infecção congênita ocorram a cada ano. As infecções podem ser diagnosticadas no período neonatal ou até várias semanas após o parto, com letalidade média abaixo de 2% (Pérez-Molina; Molina,

2018). O parasito pode ser encontrado no leite materno, motivo pelo qual recomenda-se interromper o aleitamento materno durante a fase aguda da doença de Chagas.

O sucesso no controle da transmissão da doença de Chagas no Brasil, na Argentina, no Chile e no Uruguai deve-se essencialmente a um extenso programa de eliminação de vetores domiciliados e à melhoria da qualidade do sangue e demais hemoderivados usados em transfusões (Dias, 2015). O controle dos vetores é feito com a borriiação regular de domicílios sabidamente infestados por triatomíneos. As campanhas de borriiação objetivaram a completa eliminação de *T. infestans* e a erradicação de colônias intradomiciliares de *P. megistus*, *T. brasiliensis* e outros triatomíneos que mantêm focos silvestres. Os inseticidas organoclorados (BHC e dieldrina) vêm sendo substituídos por piretroides (cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina e ciflutrina), que apresentam ação inseticida e repelente. Os ciclos de borriiação são feitos a cada 12 meses até a completa erradicação de colônias intradomiciliares de triatomíneos. Em 2006, o Brasil recebeu a certificação, pela Organização Panamericana da Saúde, de eliminação da transmissão da doença de Chagas por *T. infestans*, ainda que permaneçam focos residuais desses vetores nos estados da Bahia e Rio Grande do Sul. Os triatomíneos amazônicos de hábitos essencialmente silvestres, ainda que não colonizem as moradias humanas, são vetores importantes em comunidades ribeirinhas. Por outro lado, outras espécies de triatomíneos consideradas vetores secundários da doença de Chagas, como *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, vêm sendo encontradas com frequência no ambiente peridomiciliar e doméstico, muitas vezes infectadas com *T. cruzi*. A emergência de resistência aos inseticidas piretroides mostra-se um importante obstáculo aos programas de controle de vetores em diversos países latino-americanos; no Brasil, observa-se a resistência de *T. sordida* ao piretroide deltametrina.

A prevenção da transmissão transfusional requer a triagem sorológica dos doadores de sangue na rede de hemocentros e bancos de sangue, diretamente fiscalizados pelo Ministério da Saúde. O sangue de doadores com resultado positivo ou duvidoso deve ser descartado. Uma alternativa de alta eficácia e baixo custo, a adição de substâncias tripanocidas ao sangue a ser transfundido (como a violeta de genciana), não alcançou popularidade no Brasil. O controle da transmissão oral requer medidas de educação em saúde pública sobre os alimentos de risco e estratégias para garantir a higiene e a inocuidade dos alimentos que servem de meio para a infecção.

PARASITOLOGIA EM FOCO

Entrada e sobrevivência de *Trypanosoma cruzi* na célula hospedeira

Penetrar nas células do hospedeiro mamífero é fundamental para o estabelecimento da infecção por *T. cruzi*. Diferentes formas evolutivas do parasito interagem com um grande número de células hospedeiras distintas; portanto, não é surpreendente que o parasito apresente diferentes estratégias de invasão celular. Todas essas estratégias têm em comum: (i) o reconhecimento de receptores celulares por parte de moléculas de superfície do parasito; (ii) o desencadeamento de sistemas complexos de sinalização; (iii) a mobilização de lisossomos; (iv) a formação de um vacúolo parasitóforo, que alojará transitoriamente o parasito e fornecerá as condições ambientais adequadas para o início da sua diferenciação para a forma amastigota.

Há um consenso de que a invasão celular pode ser dividida em duas partes: reconhecimento e adesão à superfície da célula a ser infectada, e internalização. A adesão depende de uma complexa rede de receptores e moléculas de reconhecimento, enzimas que modificam glicoconjugados de membrana convertendo-os em novos receptores. A internalização ocorre mediante uma ampla variedade de processos, dos quais quatro estão bem descritos: a fagocitose, a entrada ativa, a endocitose dependente de microdomínios de membrana e a macropinocitose. Embora um processo de endocitose mediada por clatrina também seja descrito na literatura, esse mecanismo não está completamente caracterizado.

As principais moléculas de superfície dos tripomastigotas envolvidas no processo de adesão e penetração nas células hospedeiras pertencem à família da transialidase, que envolvem formas ativas e inativas dessa enzima. Sua

PARASITOLOGIA EM FOCO (continuação)

principal atividade enzimática (quando ativa) é transferir ácido siálico de sialoglicoproteínas (majoritariamente glicoproteínas do hospedeiro mamífero) para glicoconjugados, tais como glicoproteínas parasitárias, que não apresentam ácido siálico nas suas extremidades glicídicas devido à incapacidade do parasito em sintetizá-lo (Freire-de-Lima et al., 2015). Formas inativas dessa enzima são geralmente capazes de reconhecer e se ligar a resíduos galactosil-terminais. Alguns membros dessa família envolvidos na invasão celular são a gp85, gp82, gp 80 e gp35/50 e LLGP65. Uma vez que as transialidases enzimaticamente ativas catalisam a transferência de resíduos de ácido siálico para a superfície do parasito (Figura 5.14), deixam resíduos desialidados descobertos na superfície das células hospedeiras, geralmente resíduos galactosil. Dessa forma, proteínas da família das transialidases que não têm atividade enzimática mas se ligam a resíduos galactosil reconhecem esses açúcares na superfície da célula hospedeira como receptores (Mattos et al., 2014; Cortez et al., 2014). Do lado do parasito, as principais moléculasceptoras de ácido siálico são mucinas, proteínas altamente glicosiladas que parecem desempenhar um papel fundamental durante a invasão celular (Barrias et al., 2013). Sabe-se também que algumas das glicoproteínas da família da transialidase sem atividade enzimática são capazes de ligar-se a proteínas de superfície da célula hospedeira ou da matriz extracelular mediante o reconhecimento de resíduos não glucídicos. Algumas dessas interações foram bem definidas, como as que estabelecem a Tc85 com citoqueratina 18, fibronectina, laminina e integrinas (Figura 5.14) (Mattos et al., 2014).

No caso dos amastigotas liberados ao meio extracelular por lise prematura da célula infectada (amastigotas extracelulares), acredita-se que, às células hospedeiras, envolvem receptores e ligantes distintos, assim como moléculas sinalizadoras. A glicoproteína denominada “proteína estágio-específica de superfície 4” (conhecida também como Ssp-4, pelas suas iniciais em inglês) é a mais estudada dentre as envolvidas na adesão às células hospedeiras. Mostrou-se que essa glicoproteína de superfície pode ser reconhecida por galectina 3, uma lectina galactose-específica presente em uma grande variedade de tecidos em mamíferos (Bonfim-Melo et al., 2018).

A forma de internalização dos tripomastigotas mais estudada é aquela entre os parasitos e os macrófagos. Em geral, os *tripomastigotas* e *amastigotas* penetram macrófagos e outras células com grande capacidade fagocitária por meio de *fagocitose clássica*, que envolve a formação de projeções da membrana celular para englobar o parasito. Esse processo é geralmente descrito como um mecanismo de *penetração passiva*. Nele, parasitos intracelulares são inicialmente encontrados em vacúolos com características de *fagossomos*. A invasão de macrófagos ativados resulta na destruição da maioria dos parasitos, como consequência da produção de radicais superóxido e água oxigenada; não ocorre estresse oxidativo significativo, entretanto, quando os parasitos penetram macrófagos residentes.

Quando os tripomastigotas penetram em *células não fagocitárias*, como células musculares ou nervosas, não se formam projeções citoplasmáticas na célula hospedeira que caracterizam a fagocitose. A adesão do parasito a receptores de membrana da célula hospedeira desencadeia uma troca de sinais moleculares entre a célula hospedeira e o parasito, que resulta no recrutamento de lisossomos para a região da superfície onde se iniciará a invasão. Isso é definido como um *processo ativo* de invasão celular. Os lisossomos recrutados podem fundir-se à membrana da célula hospedeira, logo no início da formação do vacúolo parasitóforo que abrigará o parasito, ou fundir-se ao fagossomo já formado, quando o parasito é fagocitado (Barrias et al., 2013).

A *endocitose dependente de microdomínios de membrana* é um mecanismo comum na invasão de células fagocíticas e não fagocíticas. Há evidências de que o colesterol, componentes das denominadas “jangadas lipídicas de membranas”, está envolvido de alguma forma com a internalização: células artificialmente depletadas de colesterol nas membranas são refratárias à internalização. Ainda não está claro se o colesterol tem um papel direto na invasão ou se fornece à membrana as características mecânicas e físico-químicas necessárias para que o parasito possa ser internalizado. A presença de outros componentes de jangadas lipídicas de membranas, tais como flotilina e caveolina na interfase entre a membrana celular e a parasitária, parece confirmar a participação de microdomínios na internalização dos parasitos.

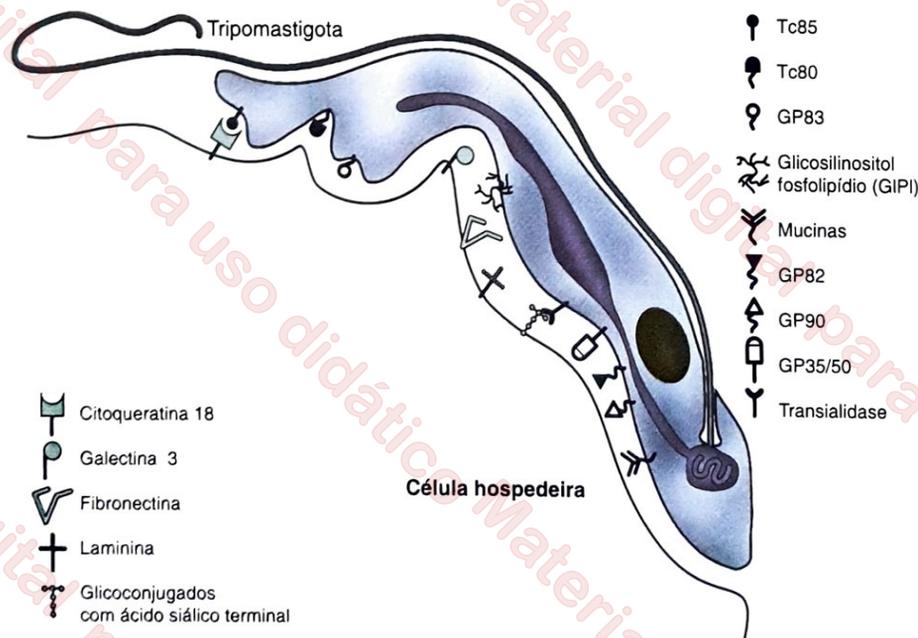


FIGURA 5.14 Principais moléculas do parasito e do hospedeiro vertebrado envolvidas nas fases iniciais de adesão de *Trypanosoma cruzi* à célula hospedeira. Adaptada de de Souza et al., 2010.

PARASITOLOGIA EM FOCO (continuação)

Tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* podem também ser internalizados mediante *macropinocitose*, um processo ativado por uma complexa cascata de sinalização dependente do reconhecimento de receptores de membrana, e que envolve uma reorganização da membrana celular dependente de actina.

O recrutamento dos lisossomos pode ocorrer previamente à formação da vacúola endocítica (por qualquer um dos mecanismos descritos) ou mais tardiamente. No primeiro caso, os lisossomos são recrutados ao local da infecção por “disparos” de sinais (aumentos) transitórios de cálcio estimulados pelo parasito. Esses sinais, em células que não estão sendo infectadas, sinalizam dano mecânico na membrana citoplasmática. A resposta celular consiste no recrutamento dos lisossomos para a região onde esse dano acontece: as membranas lisossômicas são utilizadas como material de reparo mediante um processo de fusão dependente de cálcio. Porém, o processo de recrutamento de lisossomos para o local da invasão pode se dar mais tardiamente, e esse evento pode ocorrer quando o endossomo inicial que contém um parasito já está completamente formado. É importante ressaltar que a fusão dos lisossomos ao vacúolo parasitóforo é fundamental para a sua adequação: os passos seguintes que o parasito deve seguir para estabelecer a infecção celular só acontecerão após esse evento.

Os tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de sobreviver por um período de várias horas no interior de um vacúolo resultante da fusão de lisossomos com a membrana celular. As membranas lisossômicas contribuem com bombas de prótons ATP-dependentes que acidificam o vacúolo. O baixo pH é ideal para a ação coordenada de enzimas de *T. cruzi* – como a transialidase, que instabiliza as membranas, e a Tc-TOX, que apresenta atividade tipo hemolisina – e é também necessário para dar início ao processo de diferenciação para a forma replicativa amastigota. A lise do vacúolo parasitóforo pelas enzimas parasitárias acontece entre 10 e 16 horas após a invasão, possibilitando a saída dos parasitos. No citosol das células hospedeiras, os amastigotas começam a multiplicar-se em cerca de 24 horas. Posteriormente, convertem-se transitoriamente em formas intermediárias semelhantes a epimastigotas (epimastigotas intracelulares) e finalmente diferenciam-se em tripomastigotas, que são liberados para o meio extracelular ao romper-se a célula. Em infecções crônicas, encontram-se geralmente de forma intermitente poucos tripomastigotas na corrente sanguínea, o que sugere que esse processo de multiplicação intracelular possa

ser desacelerado. De fato, recentemente foi demonstrada a presença de formas dormentes encistadas nos tecidos infectados.

Os poucos dados disponíveis sugerem que os amastigotas de *T. cruzi* sejam somente capazes de entrar passivamente, em células tanto fagocitárias quanto não fagocitárias. Durante o processo de adesão, os amastigotas induzem nas células do hospedeiro a formação de uma taça endocítica, na qual ocorre o processo de adesão e troca de sinais mediada pelo reconhecimento de receptores por parte de glicoproteínas secretadas ao espaço intercelular. Duas proteínas parasitárias foram identificadas como participantes ativos do processo de comunicação entre as células antes da fagocitose: a P21 e a mevalonato quinase, que participa da via de biossíntese de esteróis e pode ser secretada, sendo assim capaz de interagir com receptores de membrana da célula hospedeira e auxiliar na invasão. Ambas parecem capazes de desencadear uma cascata complexa de sinais que induzem o rearranjo de actina necessário para a internalização passiva do parasito (Bonfim-Melo et al., 2018).

Referências bibliográficas

- Barrias ES, de Carvalho TM, de Souza W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol*. 2013;4:186.
- Bonfim-Melo A, Ferreira ER, Florentino PT, Mortara RA. Amastigote synapse: the tricks of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Front Microbiol*. 2018;9:1341.
- Cortez C, Sobreira TJ, Maeda FY, Yoshida N. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Subcell Biochem*. 2014;74:137-50.
- de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:295394.
- Freire-de-Lima L, Fonseca LM, Oeltmann T, Mendonça-Previato L, Previato JO. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: three decades of studies. *Glycobiology*. 2015;25:1142-9.
- Mattos EC, Tonelli RR, Colli W, Alves MJ. The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*. 2014;74:151-80.

Leitura sugerida

- Alves MJ, Colli W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell Biochem*. 2008;47:58-69.
- Mott GA, Burleigh BA. The role of host cell lysosomes in *Trypanosoma cruzi* invasion. *Subcell Biochem*. 2008;47:165-73.

Referências bibliográficas

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005;52:399-451.
- Andrade AL, Zicker F, Oliveira RM et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in the treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996;348:1407-13.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:2034-9.
- Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*. 2007;59:274-9.
- Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol*. 2017;97:1-45.
- Barrias ES, Carvalho TM, Souza W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol*. 2013;4:186.
- Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI et al. 2017. Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:1510-24.
- Bonfim-Melo A, Ferreira ER, Florentino PT, Mortara RA. Amastigote synapse: the tricks of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. *Front Microbiol* 2018;9:1341.

- Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2010;14:1373-84.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347-82.
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy – a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:549-54.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 2002;18:171-6.
- Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG et al. Reservoirs: multi-purpose organelles? *Parasitol Res*. 2006;99:325-7.
- de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:295394.
- de Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:89-100.
- Dias JC. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs: historical perspective. *Glob Heart*. 2015;10:193-202.
- Guarneri AA, Lorenzo MG. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *J Insect Physiol*. 2017;97:66-76.
- Haanstra JR, González-Marcano EB, Gualdrón-López M, Michels PA. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1038-48.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 1980;27:37-58.

- Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13:995-1029.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A et al. Randomized trial of benznidazole for Chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373:1295-306.
- Paes LS, Mantilla BS, Barisón MJ et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. *Curr Pharm Des*. 2011;17:2074-99.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391:82-94.
- Pinazo MJ, Cañas E, Elizalde JI et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;33:191-200.
- Read LK, Lukeš J, Hashimi H. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7:33-51.
- Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VM et al., National Heart, Lung and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II) International Component. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013;127:1105-15.
- Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2506-12.
- Sánchez-Valdéz FJ, Padilla A, Wang W et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*. 2018;7:e34039.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54:845-52.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83:141-52.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31:550-4.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31:472-81.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1051-4.
- Zingales BS. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*. 2018;184:35-52.

Leitura sugerida

- Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2015;373:456-66.
- Duschak VG. Targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease in the last 15 years-period. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2016;11:74-173.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391:82-94.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005;5:53-64.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54:845-52.