

PRINCIPAIS HELMINTOSES NEGLIGENCIADAS – ONTEM, HOJE E AMANHÃ NO IHMT

ANA JÚLIA PINTO FONSECA SIEUVE AFONSO (A. AFONSO)
MARIA MANUELA PALMEIRO CALADO (M. CALADO)
ISABEL LARGUINHO MAURÍCIO (I.L. MAURÍCIO)
SILVANA MARIA DUARTE BELO (S. BELO)

Grupo de Helmintologia Médica, Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa. *E-mail*: SilvanaBelo@ihmt.unl.pt (S. Belo).

Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM) / IHMT.

INTRODUÇÃO

As doenças causadas por helmintas constituem cerca de 70% das designadas “doenças tropicais negligenciadas” (DTNs), das quais se destacam a schistosomose, as geohelmintoses e a filariose linfática. Estas helmintoses são responsáveis por elevada morbidade nas regiões tropicais e subtropicais, estimando-se em mais de dois mil milhões o número de indivíduos infetados. Pela amplitude dos efeitos patológicos e sociais que causam, estas doenças constituem um entrave ao desenvolvimento socioeconómico nessas regiões, comprometendo o futuro de gerações sucessivas (Hotez *et al.*, 2008).

Em áreas endémicas, estas infeções apresentam um padrão epidemiológico semelhante: são geralmente adquiridas na infância, com manifestações clínicas discretas ou assintomáticas e, na ausência de tratamento, evoluem para cronicidade, sendo as formas clínicas graves por vezes irreversíveis, detetadas apenas na idade adulta (Pullan e Brooker, 2008). Além disso, é frequente a ocorrência simultânea destas parasitoses em consequência de deficientes condições sociais, económicas e desconhecimento da população sobre os seus fatores causais e respetivas medidas de controlo, bem como de condições ambientais que propiciam a sua transmissão.

Neste sentido, o tratamento seletivo de grupos populacionais de maior risco, nomeadamente, as crianças em idade escolar, constitui uma das medidas prioritárias de controlo destas doenças a par de implementação de medidas de saneamento básico, acesso a água potável e educação sanitária.

Filarioses

Os agentes causais das filarioses incluem-se nos nemátodes, um dos maiores e mais diversos grupos de metazoários. De corpo cilíndrico e filiforme, englobam desde organismos de vida livre até espécies exclusivamente parasitas, incluindo espécies com parasitismo apenas em parte do seu ciclo de vida. As chamadas “verdadeiras, filárias” são exclusivamente parasitas de vertebrados e são transmitidas por insetos hematófagos, onde evoluem do estado de microfilária até ao de larva infetante. Este grupo pertence à ordem *Spirurida*, família *Onchocercidae*, e inclui as espécies causadoras da filaríase linfática (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori*), oncocercose (*Onchocerca volvulus*), loíase (*Loa loa*) e mansonelose (*Dipetalonema* ou *Mansonella perstans* e outras).

Os parasitas adultos são normalmente de difícil acesso, em particular na filariose linfática, por se encontrarem em vasos linfáticos profundos, podendo viver durante anos (normalmente mais de 10). As fêmeas produzem diariamente milhares de ovos embrionados que eclodem rapidamente, libertando microfilárias, forma bastante móvel e infetante para o vetor. Circulam normalmente no sangue ou em tecido subcutâneo, pelo que são estes, normalmente, os elementos de diagnóstico direto.

A filariose linfática caracteriza-se por alterações a nível do sistema linfático, muitas vezes com acumulação de fluido e edema nas extremidades, principalmente dos membros inferiores, mas também nos braços e órgãos sexuais. É, muitas vezes, chamada de “elefantíase” quando afeta os membros inferiores, devido a estes ficarem com aspeto de “patas de elefante”. As microfilárias circulam no sangue periférico principalmente à

noite, o período de maior atividade hematofágica do vetor, coincidente com o período habitual de sono do hospedeiro, ficando retidas em capilares, principalmente pulmonares, fora deste período. Contudo, tanto *B. malayi* como *W. bancrofti* apresentam formas sub-periódicas.

Na oncocercose, os parasitas adultos alojam-se em nódulos no tecido conjuntivo. As microfilárias migram frequentemente para os olhos, onde causam levam a conjuntivite e eventualmente cegueira, pelo que esta doença é também denominada “cegueira dos rios”.

Na loíase, os sintomas são causados principalmente pela migração do parasita adulto em tecido sub-cutâneo e conjuntiva ocular. Caracteriza-se principalmente por prurido acentuado, podendo causar inflamação local (edema de Calabar) quando o parasita aí permanece durante algum tempo, mas é largamente assintomática. *Loa loa* apresenta também periodicidade, mas diurna.

A filariase linfática apresenta distribuição equatorial, com 120 milhões de casos estimados, sendo 90% causados por *W. bancrofti*, principalmente na Ásia (66%) ou na África (33%). O género *Brugia* encontra-se apenas na Ásia. A oncocercose é ainda um grave problema de saúde pública, particularmente em África, mas também em seis países da América Latina e no Iémen. Estima-se que exista meio milhão de pessoas cegas devido à oncocercose e que 18 milhões de pessoas estejam infetadas. A loíase restringe-se à floresta e pântanos tropicais da África Ocidental, estando presente em Angola, e estima-se que parasite 13 milhões de pessoas.

Programas de controlo para eliminação da filariase linfática (PELF) e da oncocercose (APOC), através do tratamento em massa, foram implementados nas áreas endémicas. Em todos os casos, os tratamentos disponíveis atuam principalmente nas microfilárias, sendo normalmente pouco eficazes contra os adultos. Entre os medicamentos usados, encontram-se a dietilcarbamazina (DEC), que pode atuar nos adultos de *W. bancrofti*, e ivermectina, assim como o albendazol. Em tratamento em massa, usa-se normalmente uma combinação de dois medicamentos. A DEC pode causar reacções graves em doentes infetados com *O. volvulus* e, por seu lado, a ivermectina pode causar graves reacções adversas, principalmente a nível neurológico, em doentes infetados com *Loa loa*. Estas reacções limitam o uso daqueles anti-helmínticos no tratamento em massa nas várias regiões de co-endemicidade entre espécies de filárias. Contudo, a

descoberta da dependência destes parasitas na bactéria simbiote *Wolbachia* sp, levou à crescente utilização de antibióticos.

A investigação em filariose tem longa tradição no IHMT. Investigadores deste Instituto, principalmente Fraga de Azevedo, publicaram estudos sobre filárias desde a década de 40, tanto em Portugal como nas então colónias em África. Os primeiros estudos foram publicados em 1943 nos Anais do Instituto, então de Medicina Tropical, e incidiram, respetivamente, sobre espécies de filárias zoonóticas em cães portugueses. Aos estudos de carácter eminentemente epidemiológico, realizados nas então colónias portuguesas, como na Guiné Portuguesa, Timor e na Ilha do Príncipe, seguiram-se estudos aplicados, acompanhando os avanços científicos da época, nomeadamente no âmbito do diagnóstico, da patologia e da terapia. Azevedo, em 1964, já usa a distinção entre os géneros *Wuchereria* e *Brugia* numa revisão sobre a sua distribuição nos territórios portugueses além-mar. Estudos em Timor (Ferreira *et al.*, 1965) levaram ao reconhecimento de uma forma distinta de filariose pelo género *Brugia* em Timor (David e Edeson, 1965) e à descrição de uma nova espécie, *Brugia timori*, por Partono *et al.* (1977). A distinção morfológica a nível de microfilárias foi confirmada por Pinhão (1973), tendo, contudo, mostrado haver uma grande variação a nível de microfilárias.

A oncocercose mereceu atenção no IHMT desde a década de 1950, com a publicação dos resultados de inquéritos epidemiológicos em Angola e na Guiné Portuguesa e a descrição de lesões oculares em Angola. Barbosa *et al.* (1971) contribuíram para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico através da avaliação do uso de um novo antigénio de *O. volvulus* na técnica de fluorescência indireta em lâmina, que apresentou 100% de especificidade e 95% de sensibilidade em diluições superiores a 1/40.

A primeira menção nos Anais do IHMT a *Loa loa* é feita num estudo publicado em 1966 (Casaca, 1966), no qual também se estudaram, além de *O. volvulus*, os nemátodes *Dipetalonema perstans* (agora *Mansonella perstans*).

Os estudos sobre filárias por investigadores e alunos do IHMT prosseguiram nas últimas décadas, nomeadamente sobre filariose linfática em alunos de escolas primárias em Timor Leste (Bonaparte *et al.*, 2005), que mostrou altas taxas de prevalência infantil (21,1% e 55,6-59,3%, em duas regiões) e confirmou a periodicidade noturna, tendo sugerido padrões distintos de exposição aos vetores em regiões diferentes. As filarioses

zoonóticas têm também sido alvo de investigação no IHMT como por exemplo, em estudos de dirofilariose canina no concelho de Setúbal (Gomes, 2002).

Atualmente, a equipa de helmintologia do IHMT está a realizar estudos epidemiológicos sobre *Dirofilaria* spp. em Portugal, especificamente para determinar a sua prevalência em cães e vetores e, assim, determinar a sua dinâmica de transmissão, e fazer a sua caracterização molecular. A equipa também está a iniciar estudos de prevalência e distribuição de filariase linfática em Moçambique e Angola, incluindo estudos moleculares para determinação de diversidade genética e presença de marcadores de resistência a anti-helmínticos. Estes estudos deverão contribuir para prever e avaliar o sucesso de campanhas de controlo.

Geohelmintas

Na atual crescente e efetiva globalização, a movimentação de populações e a situação geográfica de Portugal continental têm ocasionado que diversas helmintoses figurem entre as doenças de importação detetadas com mais frequência em Portugal (Azevedo, 1976; Raposo *et al.*, 1981). O seu correto diagnóstico é fundamental para instituição de terapêutica e de medidas de controlo adequadas. Dentro deste grande grupo, estão inseridos os geohelmintas, ou seja, parasitas que, para completarem o seu ciclo de vida, necessitam obrigatoriamente de passar pelo solo. De entre estes destacam-se, como tendo maior importância na saúde humana, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e os ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*), cuja aquisição resulta do contacto com solos ou alimentos contaminados por ovos destes parasitas.

Embora ocorram casos no mundo desenvolvido, as infeções mais graves ocorrem nas áreas tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais e socioeconómicas das populações são mais favoráveis à sua transmissão. A ausência ou insuficiência de condições de saneamento básico, inadequadas práticas de higiene pessoal e doméstica e condições ambientais propícias, são os principais fatores responsáveis pela transmissão destes parasitas (WHO, 2012). A sua incidência e prevalência atingem números bastante elevados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 3,5 mil milhões de pessoas estão infetadas com parasitas intestinais, geohelmintas na sua maioria, e 450 milhões com patologia grave sendo, na sua maioria, crianças. Anualmente, ocorrem cerca de 60000 a 65000 mortes provocadas por infeções de

ascarídeos e ancilostomídeos, respetivamente. Infeções múltiplas com diferentes espécies de helmintas são comuns e levam facilmente a deficiências nutritivas, o que compromete não só o desenvolvimento físico e intelectual, principalmente em crianças, como também induzem maior vulnerabilidade a outros agentes infecciosos, contribuindo para o aumento da taxa de mortalidade infantil (Pullan e Brooker, 2008). Assim, sendo causadores de doenças negligenciadas, que atingem, em particular, as populações mais marginalizadas, a redução da morbidade provocada pelos geohelmintas é uma das metas de saúde infantil definidas nos Objetivos do Milénio.

Em Portugal, os trabalhos realizados nesta área através de inquéritos a crianças em idade escolar, têm tido, como objetivo principal, chamar a atenção para as parasitoses transmitidas por geohelmintas e as suas repercussões sobre as crianças.

No início do século XX, o Professor José Firmino Sant'Anna, um investigador multifacetado, foi dos primeiros investigadores Portugueses a publicar sobre helmintologia, na então Escola de Medicina Tropical, em 1909. Contudo, é apenas em 1913 que surge, nos "Arquivos de Higiene e Patologia Exóticas", um estudo sobre geohelmintas, especificamente sobre ancilostomídeos ("anquilostomiase") em São Tomé, por Bruto da Costa. Os ancilostomídeos foram, desde então, um dos principais temas de pesquisa no IHMT, com várias publicações de estudos feitos em Portugal e nas então províncias ultramarinas. Esta particular atenção aos ancilostomídeos levou a estudos específicos sobre os efeitos daqueles parasitas no hospedeiro humano como, por exemplo, sobre a citocímica leucocitária na ancilostomiase, estudos nutricionais, e até mesmo "tolerância" a estes parasitas, principalmente na década de 1950.

Em certas regiões, com condições climáticas favoráveis, a prevalência de ancilostomídeos em Portugal chegou a ser bastante alta. Um estudo realizado no distrito de Coimbra encontrou uma prevalência de ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale*), em humanos, superior a 60% (Azevedo *et al.*, 1948). Contudo, a prevalência dos geohelmintas diminuiu significativamente em Portugal continental, até que, nos últimos anos, pesquisas em solos e em crianças em idade escolar, onde as geohelmintoses tendem a ser mais prevalentes, revelaram que estes parasitas têm uma expressão quase nula ou, pelo menos, muito baixa, mesmo em algumas regiões rurais (Peraboa, 2002;

Lobo, 2011). Esta diminuição deve-se principalmente à melhoria das condições sanitárias e de saneamento básico e também à implementação da rede de saúde escolar.

A investigação atual sobre geohelmintas (como outros parasitas intestinais) no IHMT é maioritariamente realizada em países tropicais, como Angola, Guiné, Moçambique, Timor-Leste e Brasil. Estudos recentes encontraram prevalências de 20-22% de *A. lumbricoides*, 3-8% de *T. trichiura* e 2-5% de ancilostomídeos em duas localidades de Timor (Rêgo, 2004), semelhantes às encontradas para *A. lumbricoides* em duas províncias de Angola (11-28%), mas distintas para *T. trichiura* (0,7-3%) e ancilostomídeos, para os quais se registou uma grande amplitude (2-20%) (Dumba, 2006). Estas prevalências são suficientemente altas para afetar o desenvolvimento infantil, tendo sido encontrada correlação estatisticamente significativa entre a anemia por deficiência de ferro em mulheres grávidas e presença de *T. trichiura* (Jeremias, 2006).

Considerando que o combate às parasitoses transmitidas pelo solo é um dos objetivos da Organização das Nações Unidas para o milénio (Fenwick *et al.*, 2005), o grupo de Helminologia do IHMT continuará a apoiar investigação nesta área, assim como na formação, contribuindo para a seleção de medidas de controlo mais adequadas e eficazes.

Schistosomose

A schistosomose é uma doença parasitária causada por tremátodes digenéticos do género *Schistosoma*. Devido à sua ampla distribuição e elevada morbidade, é considerada a segunda parasitose de maior impacto em saúde pública, em particular nos países em vias de desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais.

A dinâmica epidemiológica da schistosomose humana é heterogénea e complexa: envolve um hospedeiro definitivo (vertebrado), um hospedeiro intermediário (moluscos gastrópodes), contaminação com excreta de indivíduos infetados de meios aquáticos, e exposição a esse meio por motivos ocupacionais, recreativos, domésticos ou higiénicos.

Atualmente, cerca de seis espécies do género *Schistosoma* causam doença em humanos, sendo as mais importantes *Schistosoma haematobium*, responsável pela patologia urogenital, e *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, agentes

da forma intestinal. Outras espécies afetam os humanos apenas ocasionalmente.

Os ovos das espécies responsáveis pela patologia intestinal são eliminados nas fezes e os de *S. haematobium* na urina do hospedeiro infetado. Ao entrarem em contacto com água doce (lagoas, rios), eclodem, libertando larvas ciliadas (miracídios), forma infetante para o caracol. Neste, o parasita multiplica-se e desenvolve-se em cercárias (forma infetante para o Homem), cuja eliminação coincide temporalmente com os hábitos humanos de contacto com água, e têm capacidade de penetrar ativamente na pele. Após 2-6 semanas de infeção, começam a ser produzidos ovos, recomeçando o ciclo de vida. Nesta fase, o diagnóstico pode ser realizado por pesquisa de ovos nas fezes ou na urina.

Dos 200 milhões de pessoas infetadas e 600 milhões expostas à infeção, 80% ocorrem no continente africano (Hotez e Fenwick, 2009; WHO, 2006). O número de DALYs (*disability adjusted life years*) causado por *Schistosoma* spem África (70 milhões) está significativamente subestimado (King *et al.*, 2008). A schistosomose é, assim, uma endemia de grande impacto epidemiológico e, mais importante, um problema socioeconómico grave, sendo uma doença gravemente negligenciada.

As lesões patológicas são provocadas principalmente pelos granulomas periovulares e fibrose, induzidos pela resposta inflamatória aos antígenos libertados dos ovos retidos nos tecidos. As lesões causadas por *S. haematobium* afetam sobretudo o sistema genito-urinário, podendo causar obstrução, insuficiência renal e neoplasia. À schistosomose urogenital tem sido atribuída baixa saúde reprodutiva, incluindo disfunção sexual e infertilidade (Takougang *et al.*, 2008), assim como a transmissão horizontal do VIH e da sida (Kjetland *et al.*, 2006). Na schistosomose intestinal por *S. mansoni* (e pelas outras espécies), as lesões localizam-se principalmente no aparelho gastrointestinal tendo, como consequência grave, o comprometimento hepático (Maxwell, 2008; Van Le *et al.*, 2004).

Os métodos de diagnóstico parasitológico (como Kato-Katz e filtração da urina - métodos padrão) e imunológico (mais sensíveis em infeções leves) apresentam limitações, em particular na fase inicial do parasitismo, na avaliação da eficácia do tratamento e na possibilidade de reações cruzadas com outras parasitoses. Assim, as técnicas moleculares, baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR), aumentam a sensibilidade e a especificidade de deteção, as quais são oito vezes

superiores às da técnica de Kato-Katz e quatro vezes superiores às das técnicas imunológicas. Igualmente, podem permitir o diagnóstico simultâneo de várias espécies de *Schistosoma* spp., particularmente útil em estudos epidemiológicos.

O controlo da schistosomose depende da quimioterapia com praziquantel (PZQ). O tratamento em massa tem sido implementado como estratégia de controlo, visando redução da morbidade e da transmissão da parasitose. A sua implementação em vários países de África, Médio Oriente, América do Sul e Ásia tem tido um impacto significativo na redução da prevalência e da morbidade (Koukounari *et al.*, 2007).

Com exceção de Cabo Verde, a schistosomose é endémica em todos os países africanos de expressão portuguesa. O IHMT sempre contribuiu significativamente para o conhecimento epidemiológico e controlo da parasitose nestes países. Em Moçambique, foi realizada uma missão chefiada pelo Professor Fraga de Azevedo em 1952, o que permitiu, pela primeira vez, não só conhecer a epidemiologia, distribuição e incidência da schistosomose vesical (61,5%) e da schistosomose intestinal (11,85%) no país e respetivos hospedeiros intermediários, mas também efetuar os primeiros ensaios coordenados na luta contra esta parasitose (Azevedo *et al.*, 1954).

Em Angola, desde 1896 até aos anos 70, o IHMT esteve envolvido em numerosos estudos que permitiram conhecer a distribuição e morbidade da schistosomose vesical e intestinal no país (Ferreira, 1953; Grácio 1977/1978a). Na Guiné-Bissau, a identificação dos primeiros focos de schistosomose vesical, a sua distribuição e prevalência datam de 1949, sendo o conhecimento atual da situação epidemiológica resultante de estudos efetuados na década de 1990, tendo-se descrito, pela primeira vez, a ocorrência de *S. mansoni* na região leste do país, identificado os hospedeiros intermediários e registado os

primeiros focos de schistosomose vesical na área suburbana de Bissau (Grácio 1992; Grácio 1995). Em S. Tomé e Príncipe, os estudos realizados em 1988 contribuíram significativamente para o conhecimento e clarificação da epidemiologia de *S. intercalatum* (Grácio, 1988).

Apesar das atividades de controlo resultarem no declínio da prevalência, as mudanças ambientais ligadas ao desenvolvimento e manuseamento de recursos hídricos, o aumento dos movimentos populacionais e as alterações climáticas, incluindo o aquecimento global, têm levado à disseminação da parasitose em regiões de baixa ou nenhuma endemicidade, particularmente na África subsaariana (Mangal *et al.*, 2008). O uso sistemático de PZQ começa a apresentar algumas limitações na ação terapêutica. Casos de fármaco-resistência ou aumento da tolerância têm sido relatados.

A investigação atual no IHMT pretende clarificar os mecanismos genéticos que poderão estar envolvidos nesta fármaco-resistência. Nos últimos dois anos, conseguimos selecionar, por pressão de fármaco, uma linha de *S. mansoni* derivada da linha BH, seis vezes resistente à dose terapêutica recomendada em humanos (40 mg/kg), a qual se mantém após passagem por molusco hospedeiro intermediário. No âmbito desta linha de investigação, propomos: i) avaliar potenciais reversores do fenótipo de resistência; ii) comparar os parasitas sensíveis e resistentes a nível genómico e proteómico; iii) inferir a influência do fármaco na expressão génica; iv) clarificar o mecanismo genético de resistência ao PZQ, em modelo experimental e em amostras de campo de doentes infetados. Estes estudos contribuirão para avaliar novos fármacos ou novas combinações terapêuticas, o que deverá maximizar a utilização dos poucos fármacos disponíveis para controlo desta patologia.