

Captação de ferro pelos parasitos do gênero *Leishmania*

Iron uptake by parasites *Leishmania*

MALAFIA, Guilherme
Laboratório de Imunoparasitologia
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Ouro Preto – Minas Gerais - Brasil
Correspondência para autor: guilherme@nupeb.ufop.br

Recebido em 21 de maio de 2008; aceito em 06 de agosto de 2008.

RESUMO

O ferro é um cofator essencial para várias enzimas e rotas metabólicas, incluindo aquelas requeridas para a replicação dos parasitos do gênero Leishmania no interior de suas células hospedeiras, normalmente os macrófagos. A aquisição de ferro emerge como um campo de batalha no qual os sistemas de importação de ferro dos microrganismos são colocados contra os sistemas de retirada férrea e seqüestro pelos macrófagos, em que ambos competem pelo ferro na interface "parasito-hospedeiro". Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo apresentar por meio de uma revisão crítica da literatura, os aspectos mais recentes sobre a captação de ferro pelos parasitos do gênero Leishmania. A caracterização recente na espécie Leishmania (Leishmania) amazonensis do transportador de ferro LIT1, encontrado nas formas intracelulares e requerido para a sobrevivência e replicação bem como para sua virulência in vivo, provê um bom exemplo da adaptação desses protozoários ao ambiente intrafagolisossomal pobre em ferro. As evidências apresentadas neste trabalho demonstram que a proteína LIT1 é essencial para a replicação dos parasitos dentro de fagolisossomos de macrófagos e para o desenvolvimento da patologia em modelos experimentais. Até recentemente não estava claro de que forma os parasitos Leishmania estariam equipados para lidar com a captação de ferro do organismo hospedeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania, leishmanioses, ferro, macrófagos, transportadores de ferro*

ABSTRACT

Iron is a co-factor for several essential enzymes and biochemical pathways, including those required for replication of pathogens such as Leishmania in inside their cells hosts, usually macrophages. Iron acquisition is emerging as a key battleground in which the iron import systems of microbes and the iron withdrawal and sequestration systems of macrophages, both competing for iron in the interface parasite-host. Thus, this study aims to present the most recent aspects about the iron uptake by parasites of genus Leishmania. The recent characterization of a ferrous iron transport LIT1 in Leishmania amazonensis is induced intracellularly and is required for survival in macrophages and for virulence in vivo, provides a good example of the adaptation of a protozoa to the iron-poor phagolysosomal environment. The evidences presented in this project demonstrate that LIT1 is essential for replication of the parasites within macrophage phagolysosomes and for the development of pathology in experimental models. Until recently it was not clear how Leishmania is equipped to deal with iron uptake.

KEY WORDS: *Leishmania, leishmaniasis, iron, macrophages, iron transporters*

I. INTRODUÇÃO

Desde que os cientistas passaram a reconhecer a importância do elemento ferro na homeostasia do organismo, muitos estudos foram e continuam sendo desenvolvidos com o intuito de compreender de forma específica o seu papel nas funções orgânicas e a sua importância na sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos no organismo hospedeiro. De acordo com Cook et al. (1992), o ferro é um dos micronutrientes mais estudados e melhor descritos na literatura, o qual desempenha funções importantes no metabolismo tais como transporte e armazenamento de oxigênio, reações de liberação de energia na cadeia respiratória, conversão de ribose em desoxirribose, sendo co-fator de algumas reações enzimáticas e de inúmeras outras reações metabólicas essenciais (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; BEARD et al., 1996; MALAFIA, 2008).

Com relação ao sistema imune, diversos estudos têm apontado grande importância do ferro no seu funcionamento, principalmente, ao se constatar que a deficiência do elemento leva a defeitos tanto na resposta imune adaptativa quanto na resposta imune inata do organismo, acarretando alterações significativas nas suas funções protetoras (DHUR et al., 1989; FARTHING, 1989; OPPENHEIMER & HENDRICKSE, 1983; HERSHKO et al., 1988; HERSHKO, 1993; SCRIMSHAW & SAN GIOVANNI, 1997; OPPENHEIMER, 1994, 1998, 2001).

Nos estudos revistos por Hughes & Kelly (2006), os autores constataram que os defeitos na resposta imune adaptativa incluem a redução da proliferação, diferenciação e número de células T, bem como a diminuição da produção de citocinas por essas células. Já os defeitos na resposta imune inata, incluem a redução da capacidade fagocitária dos neutrófilos, provavelmente devido à baixa atividade mieloperoxidase e falhas na atividade das células natural killers (NK) (OPPENHEIMER, 2001).

No que tange aos protozoários do gênero *Leishmania*, eles são parasitos intracelulares causadores das leishmanioses, um grupo de doenças que afeta milhões de pessoas no mundo (BRASIL, 2007). As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros, vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (MARZOCHI & MARSDEN, 1991; ASHFORD et al., 1992). Cada forma apresenta um perfil epidemiológico distinto. As formas tegumentares no Brasil são determinadas por seis espécies, cinco do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansonii*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (Leishmania) amazonensis*, a forma mucosa, pela *L. (V.) braziliensis* e, eventualmente, pela *L. (V.) guyanensis* e a forma visceral por única espécie, do subgênero *Leishmania*: a *Leishmania (L.) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987; MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2008), as leishmanioses ocorrem em 88 países, sendo 72 deles, países em desenvolvimento. É observada uma incidência mundial de 1 a 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) por ano e cerca de 500 mil casos de leishmaniose visceral (LV). Mais de 90% dos casos de LC ocorrem em países como Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e cerca de 90% dos casos de LV estão concentrados nas áreas rurais e suburbanas de países como Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil (DESJEUX, 2004; CHAPPUIS et al., 2007). A forma visceral ocorre em vários centros urbanos brasileiros, como São Luís-MA (NASCIMENTO et al., 1996; CALDAS et al., 2001), Teresina-PI (WERNECK et al., 2002) e Salvador-BA (CUNHA et al., 1995). Também é encontrada em países como a Venezuela (AGUILAR et al., 1998; DELGADO et al., 1998) e Colômbia (TRAVI et al., 1998).

No que se refere à biologia dos parasitos do gênero *Leishmania*, esses possuem ciclo de vida do tipo heteroxênico, envolvendo hospedeiros mamíferos e o inseto vetor susceptível (flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (READY, 2000; ROGERS & TITUS, 2003) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (SILVA & GOMES, 2001; ROGERS & TITUS, 2003). No hospedeiro mamífero, inclusive no homem, o desenvolvimento biológico dos parasitos é similar entre as diferentes espécies: formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) são introduzidas no hospedeiro através da picada da fêmea do inseto vetor (KILLICK-KENDRICK, 1979). No hospedeiro vertebrado, rapidamente tais formas entram em contato com fagócitos, predominantemente macrófagos, e transformam-se, no interior destes, em formas ovais não flageladas denominadas amastigotas (resistentes à ação das enzimas lisossomais) (CHANG, 1983). As formas amastigotas replicam no interior dos fagolisossomos das células do sistema fagocítico mononuclear e a partir destas espalham a infecção para células hospedeiras adjacentes (GOSSAGE et al., 2003; DOMINGUEZ et al., 2003) (Figura 1).

Diante da constatação de que o ferro é co-fator essencial de diversas enzimas agindo como mediador de suas trajetórias bioquímicas, incluindo aquelas requeridas para a replicação dos parasitos *Leishmania* no interior dos macrófagos (PARAMCHUK et al., 2002; WILSON & BRITIGAN, 1998; MARQUIS & GROS, 2007; HUYNH & ANDREWS, 2008), este trabalho apresenta os mecanismos recentemente elucidados pelos quais esses parasitos importam ferro do organismo e o utilizam, permitindo sua sobrevivência no interior dos fagolisossomos. Além disso, chama a atenção para a importância da compreensão dos mecanismos que possibilitam a sobrevivência e a replicação desses parasitos nas células hospedeiras, sobretudo diante da possibilidade de desenvolvimento de novas drogas eficientes contra as leishmanioses. Na interação "parasito-hospedeiro" observa-se não somente que os patógenos possuem estratégias utilizadas para o recrutamento e/ou retenção de nutrientes enquanto parasito de células hospedeiras, como estas por sua vez, conseguem obter meios de inviabilizar a sobrevivência dos agentes infecciosos por diferentes mecanismos. A compreensão dos mecanismos específicos que regem a infecção por *Leishmania* e a utilização do ferro pelo parasito e pelo hospedeiro emergem como um grande desafio para as ciências biológicas e na medida em que novos estudos são desenvolvidos é importante a divulgação destes.

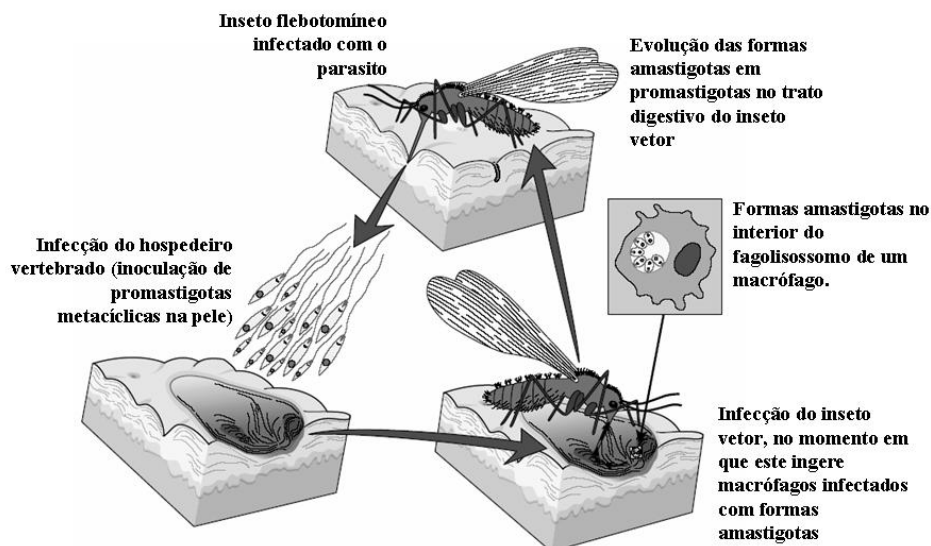


Figura 1. Diagrama esquemático do ciclo de vida de um parasito do gênero *Leishmania* causador da leishmaniose cutânea. (Modificado de Kedzierski *et al.*, 2006).

II. MÉTODOS

Este trabalho consistiu de um levantamento bibliográfico, especialmente de periódicos científicos pesquisados nas seguintes bases de dados: LILACS- BIREME (Base de dados da literatura Latino Americana, em Ciência da Saúde), MEDLINE/Index Medicus (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*) e PubMed (mantido pela *National Library of Medicine*). A pesquisa realizada utilizou os seguintes termos de indexação em várias combinações: 1) *Leishmania*; 2) *iron*; 3) *Nramp1*; 4) *LIT1*; 5) *macrophages*; 6) *leishmaniasis*; 7) *intracellular pathogens*; 8) *phagolysosomes*; 9) *parasites*; 10) *infections*; 11) *phagosomal environment* e 12) *metal transporter*. Foram escolhidos para análise dos resultados e discussão acerca do tema, trabalhos publicados entre os anos de 1937 e 2008, utilizando como critérios de seleção os seguintes itens: i) artigos que tratam das infecções causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania*; ii) artigos que tratam dos efeitos diretos do elemento ferro sobre o curso dessas infecções; iii) artigos sobre as adaptações dos parasitos as quais possibilitam a obtenção do ferro; v) procedência e idioma (artigos nacionais e internacionais publicados em revistas especializadas com considerável índice de impacto ou conceito Qualis/CAPES) e vi) tipo de publicação: periódicos.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Relação “parasito/hospedeiro”

Sabe-se que no hospedeiro vertebrado, além dos mecanismos de defesa observados nos macrófagos (i.e.: pH acidificado no interior dos fagolisossomos, proteínas microbicidas, enzimas hidrolíticas, etc.) as concentrações de nutrientes, incluindo a do elemento ferro, não estão disponíveis livremente para os microrganismos invasores (WILSON & BRITIGAN, 1998). O ferro, de acordo com Wessling-Resnick (2000), encontra-se em associação com proteínas ligantes de alta afinidade como a lactoferrina – localizada nas superfícies mucosas e secreções exócrinas como muco e lágrimas, que podem dificultar o crescimento de microrganismos nessas vias de entrada – e a transferrina, uma glicoproteína encontrada no plasma sanguíneo que em função de sua alta afinidade pelo ferro limita a disponibilidade dele aos microrganismos. Além disso, em muitas doenças infecciosas ocorre um ajuste no metabolismo do ferro caracterizado pela hipoferrêmia, em que há redução dos níveis de saturação da transferrina (GERMANO, 2002). Como os microrganismos patogênicos requerem comumente o ferro para o crescimento, proliferação e virulência, a resposta hipoferrêmica acaba reduzindo a disponibilidade do elemento aos patógenos invasores (MALAFAIA, 2008).

No caso específico dos parasitos do gênero *Leishmania*, as formas intracelulares possuem grandes concentrações de enzimas dependentes de ferro que as protegem dos mecanismos microbicidas dos macrófagos como, por exemplo, as metaloenzimas superóxido dismutases (SODs) (PARAMCHUK *et al.*, 1997; FANG, 2004).

Essas enzimas, de acordo com os estudos de Fridovich (1978), Plewes *et al.* (2003) e Getachew & Gedamu (2007), têm um importante papel na desintoxicação de intermediários reativos de oxigênio, incluindo

os ânions superóxidos (O₂⁻), produzidos pelos macrófagos em resposta à infecção por microrganismos invasores. Segundo Bricks (1994), quando há suprimento adequado de ferro, os macrófagos, por meio do mecanismo oxidativo, produzem superóxido utilizando enzimas que contêm ferro. O O₂⁻ produzido é, então, transformado em peróxido de hidrogênio que, ao ligar-se à enzima mieloperoxidase, passa a ter uma ação citolítica sobre esses patógenos. Em contraste, em quadros de deficiência de ferro, os macrófagos não produzem O₂⁻ e, conseqüentemente, peróxido de hidrogênio para ligar-se à mieloperoxidase e promover a lise celular dos patógenos invasores (BRICKS, 1994).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de genes SOD (relacionados com a expressão de SODs) em várias espécies do gênero *Leishmania*, incluindo *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* (GENETU et al., 2006) e *L. (L.) major* (IVENS et al., 2005). Nesses estudos, a resistência ao stress oxidativo é correlacionada justamente com a habilidade dos parasitos *Leishmania* sobreviverem e proliferarem no interior dos macrófagos, o que corrobora outros trabalhos que demonstram que a geração de espécies reativas de oxigênio e radicais hidroxilas é o principal mecanismo microbicida nessas células, conforme descrito por Bogdan & Rollinghoff (1998), Vander Veen (2000), Brunet (2001) e Stafford et al. (2002). Contudo, esses estudos não abordam a questão da participação do ferro na produção dessas espécies reativas, e de longe discutem sobre como os parasitos do gênero *Leishmania* burlam o mecanismo de defesa de suas células hospedeiras. A captação de íons férreos requerida para as funções anti-oxidantes e outras reações metabólicas parece crucial para a sobrevivência dos parasitos *Leishmania* culminando em um particular problema para esses microrganismos, o qual deve ser superado.

Proteínas Nramp1 e LIT1

No recente estudo de Lipoldova e Demant (2006), no qual modelos murinos foram utilizados, os autores deram um grande passo no entendimento da interação “parasito-hospedeiro” quando evidenciaram a existência de um complexo multigenético ligado à sobrevivência dos parasitos *Leishmania* no interior dos fagolisossomos e, conseqüentemente, à susceptibilidade a leishmanioses. Dentre os integrantes desse complexo, um dos melhores determinantes da susceptibilidade a infecções por *Leishmania* em ratos, e que está diretamente envolvido na defesa das células hospedeiras contra os parasitos invasores, é o gene *Nramp1* também conhecido como *Slc11a1*, codificador da proteína transportadora de metal Nramp1.

Como pode ser observada na figura 2, a proteína Nramp1 é um componente de membrana presente no compartimento lisossomal de células do sistema mononuclear fagocitário (i.e.: macrófagos) que funciona como um canal proto-dependente que remove íons Fe²⁺ e Mn²⁺ do ambiente intra-fagolisossomal representando um mecanismo chave da defesa dessas células contra os parasitos invasores (CELLIER et al., 1997; GRUENHEID e GROS, 1997; GOVONI et al., 1999; BUENO, 2006). Além disso, de acordo com Blackwell et al. (2003), o gene *Nramp1* está relacionado diretamente com a função dos macrófagos, incluindo a regulação de genes codificadores de quimiocinas ou citocinas (tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1b) além da indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase indusível (iNOS) por estas células.

De acordo com os estudos de Bogdan e Rollinghoff (1998), Van der Veen (2000), Brunet (2001) e Stafford; Neumann e Belosevic et al. (2002), o óxido nítrico (NO) é produzido nos macrófagos a partir da *L*-arginina, em uma reação catalisada pela iNOS sendo importante para a eliminação do parasito do gênero *Leishmania*.

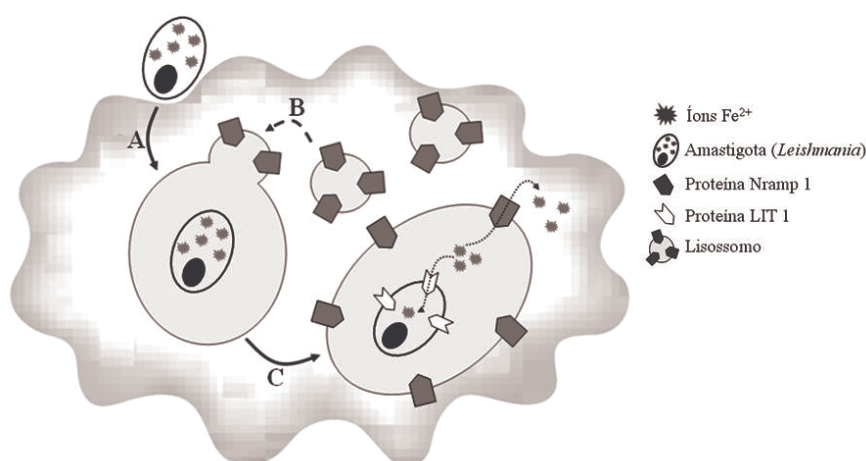


Figura 2. Transporte de ferro através das proteínas Nramp1 e LIT1 em um macrófago infectado por *Leishmania*. As proteínas Nramp1 são expressas na membrana dos lisossomos de macrófagos infectados. Após a fagocitose dos parasitos (A) e fusão dos lisossomos com o fagossomo formado (B), as proteínas Nramp 1 se espalham pela membrana do fagolisossomo (C). As proteínas LIT1, por sua vez são expressas pelas formas intracelulares do parasito e funcionam como um transportador de íons Fe²⁺ para o seu interior. Modificado de Marquis & Gros (2007).

Contudo, é importante ressaltar que no estudo de Lipoldova e Demant (2006) não é elucidado o mecanismo de ação da proteína Nramp1. Nesse caso, dois mecanismos de ação da proteína Nramp1 são descritos. O primeiro sugere que a proteína transportaria íons férreos para o interior do fagolisossomo aumentando o conteúdo de ferro para sustentar a geração de radicais hidroxilas, altamente tóxicos e com atividade bactericida (ZWILLING et al., 1999). Já o segundo mecanismo seria o da proteína Nramp1 transportar íons para fora do fagolisossomo, transporte esse dependente de pH (FORBES; GROS, 2003). A diminuição do conteúdo iônico dentro dos fagolisossomos, principalmente Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , controlaria a proliferação de microrganismos intracelulares em fagócitos (FORBES; GROS, 2003).

Segundo Forbes e Gros (2001), mutações no gene *Nramp1* aumentam a susceptibilidade do hospedeiro a infecções por *Leishmania* e quando quelantes da proteína Nramp1 são utilizados em estudos experimentais, os parasitos conseguem se replicar normalmente no interior dos fagolisossomos o que indica que a disponibilidade de ferro no interior dos fagolisossomos é essencial para a sobrevivência e replicação desses patógenos, conforme exposto também no estudo de Greenwood Gros (2000). Além disto, há evidências de que o gene *Nramp1* está relacionado à susceptibilidade à infecção canina por *Leishmania*. No estudo de Altet et al. (2002), após seqüenciarem o gene *Nramp1* canino e analisarem variantes de sucessão que poderiam estar associadas à susceptibilidade à LV em cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum*, os autores observaram uma forte associação entre o gene estudado e a susceptibilidade à LV. Já no estudo de Sanchez-Robert (2005), os autores observaram uma associação significativa entre o gene *Nramp1* e a susceptibilidade à LC após analisarem cinco genes polimórficos do gene *Nramp1* em um estudo de caso envolvendo 97 cães.

Nesse sentido, para que os parasitos do gênero *Leishmania* consigam sobreviver e se reproduzir no interior de suas células hospedeiras são necessárias estratégias que burlam o sistema defensivo celular e que possibilitem o recrutamento e/ou a retenção de íons Fe^{2+} no interior dos fagolisossomos. Sendo assim, quais seriam os mecanismos apresentados por esses parasitos?

É evidente que nos últimos anos, estudos como os desenvolvidos por Sacks e Noben-Trauth (2002); McMahon-Pratt e Alexander (2004) e Stanley e Engwerda (2007) muito contribuíram para a compreensão da relação existente entre o sistema imune do hospedeiro e a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, contudo, muito pouco se sabe sobre como o ferro é captado por esses parasitos.

No estudo recente desenvolvido por Huynh et al. (2006), no qual os mecanismos que regem a infecção por *L. (L.) amazonensis* foram investigados, os autores identificaram e caracterizaram a proteína LIT1 (Figura 3), uma proteína de membrana da família dos transportadores ZIP cuja função está relacionada com o transporte de ferro para o interior do parasito, e conseqüentemente, com a sobrevivência e replicação das formas amastigotas nos fagolisossomos (GUERINOT, 2000). De acordo com Huynh et al. (2006), a proteína LIT1 encontrada nos parasitos *L. (L.) amazonensis* possui grande similaridade com os transportadores de íons Fe^{2+} encontrados nas plantas *Arabidopsis thaliana*.

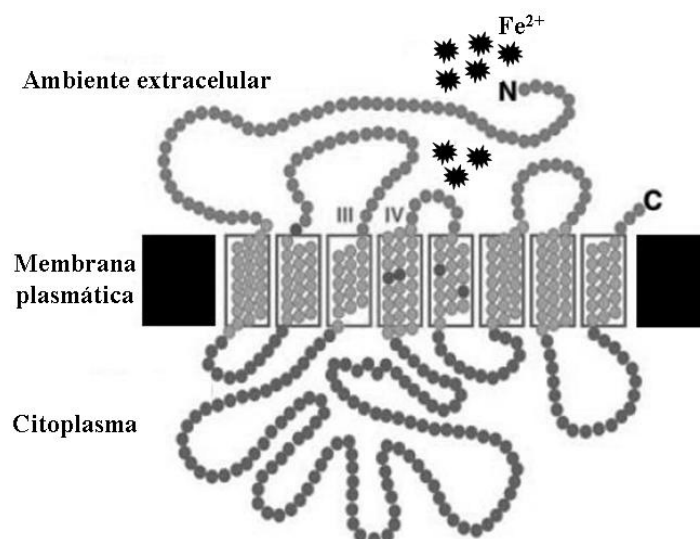


Figura 3. Topologia da proteína LIT1 na membrana plasmática do parasito *Leishmania*. Os aminoácidos de cores mais claras presentes na membrana plasmática dos parasitos representam o domínio transmembrana da proteína e os aminoácidos mais escuros nesse domínio correspondem aos resíduos também encontrados no transportador de ferro ITT1 da planta *Arabidopsis*. Os domínios transmembrana III e IV são indicados. Modificado de Huynh & Andrews (2008).

Ao compararem o tempo e a extensão da expressão da proteína LIT1 pelas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no interior de macrófagos normais (macrófagos *Nramp1*) e com mutações no gene *Nramp1* (macrófagos *Nramp1*), Huynh et al. (2006) observaram uma expressão acelerada da proteína LIT1 pelos parasitos quando estes se encontravam em fagolisossomos de macrófagos *Nramp1*. Além disto, foi demonstrado que a proteína LIT1 possui papel determinante na virulência da espécie de *Leishmania* estudada, uma vez que ao inativarem a proteína os autores observaram uma redução na viabilidade dos parasitos e falhas nos mecanismos de replicação dos patógenos nos macrófagos de medula óssea (*in vitro*), bem como uma diminuição da virulência dos parasitos em camundongos da linhagem BALB/c (*in vivo*).

Esses resultados vão ao encontro dos achados sobre a sobrevivência e replicação de espécies patogênicas pertencentes a dois outros diferentes gêneros de patógenos – *Salmonella* e *Mycobacterium* –, os quais sugerem a participação de proteínas semelhantes à LIT1 na obtenção de ferro pelos parasitos e que reforçam o papel dessas proteínas na sobrevivência dos parasitos intracelulares. No caso dos parasitos causadores da tuberculose (*M. bovis* e *M. avium*), estes sobrevivem no interior de macrófagos inibindo a maturação dos fagossomos e o recrutamento dos lisossomos, processos esses dependentes de um suprimento adequado de ferro no ambiente intrafagossomal (CLEMENS e HORWITZ, 1995). Já no caso de infecções por *Salmonella*, tem sido demonstrado não somente que o adequado suprimento de ferro é essencial para a sua virulência *in vivo*, mas também para a sua replicação em macrófagos (*in vitro*). Na *S. enterica* sorotipo *Typhimurium*, por exemplo, são observados diversos transportadores de ferro como o fepBCDG, sitA-D, feoABC, corAD e mntH, muito dos quais são cruciais para a virulência do parasito *in vivo* (ZHOU et al., 1999; BOYER et al., 2002).

É importante que se perceba que os estudos de identificação, caracterização e elucidação dos mecanismos relacionados à obtenção de ferro pelos parasitos *Leishmania*, ainda se encontram em fase inicial e muito limitados, o que dificulta a comparação de resultados e, conseqüentemente, uma análise mais acurada da literatura especializada. O estudo de Huynh et al. (2006) – o único trabalho encontrado na literatura consultada, envolvendo a temática proposta no presente artigo e o primeiro a caracterizar um transportador de ferro encontrado em parasitos do gênero *Leishmania* – veio contribuir com a elucidação de um dos mecanismos presentes na espécie *L. (L.) amazonensis*. Contudo, é importante ressaltar que muitas outras questões necessitam ser esclarecidas, tanto no que tange a essa espécie quanto às demais causadoras das leishmanioses.

Tomando-se por base o trabalho de Huynh et al. (2006), fica evidente a necessidade de desenvolvimento de outros estudos no sentido de esclarecer os mecanismos pelos quais a expressão da proteína LIT1 é restrita às formas amastigotas e se esta expressão é ativada pelo ambiente fagolisossomal pobre em íons Fe^{2+} ou se existem outros fatores ativadores. Além disto, quais seriam os mecanismos presentes nas formas extracelulares (promastigotas) dos parasitos do gênero *Leishmania* que permitem a aquisição férrea?

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em um contexto mais amplo, a identificação das particularidades envolvendo a biologia das diferentes espécies de *Leishmania* e a compreensão de como essas particularidades se correlacionam podem explicar muitas indagações sobre as diferentes formas clínicas das leishmanioses ainda não compreendidas. Para o entendimento do processo global de infecção por *Leishmania* e de como essas infecções levam a quadros clínicos diferenciados é necessário que se compreenda como estes parasitos burlam as defesas celulares, sobrevivem e se reproduzem no organismo hospedeiro. Além disto, a elucidação desses mecanismos pode significar novos avanços na quimioterapia das leishmanioses, principalmente diante da possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos e formulações capazes de atuar de maneira mais específica e eficiente contra os parasitos invasores.

Atualmente os antimonials pentavantes (Sb^{5+}) são a primeira opção terapêutica utilizada no Brasil assim como na maioria dos demais países onde as leishmanioses são prevalentes. Porém, as doses desses medicamentos podem ser cardiotoxícas e falhas no tratamento usando tais drogas têm sido relatadas no mundo todo. A segunda linha de tratamento, a anfotericina B, um antibiótico poliênico, também tem apresentado falhas no tratamento da doença e muitas vezes tem levado a prejuízos no funcionamento dos rins, órgãos alvos da toxicidade desse fármaco (RATH et al., 2003).

O desenvolvimento de novas drogas eficientes e menos tóxicas poderia servir de medida de controle das leishmanioses nas cidades, uma vez que têm sido percebidos avanços das doenças para a periferia de grandes centros urbanos do mundo. No Brasil, por exemplo, de acordo com os estudos revistos por Gontijo e Melo (2004), em 19 dos 27 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV, e de 1999 a 2004 ocorreram aproximadamente 3.500 casos humanos, sendo a maioria na região Nordeste do país, conforme relatado nos estudos de Nascimento et al. (1996), Caldas et al. (2001), Werneck et al. (2002) e Cunha et al. (1995). No caso da LC, entre os anos de 1985 e 2005, foi verificada uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e um coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2007).

Diante das diversas funções atribuídas ao ferro e da constatação de que seu papel na infecção por *Leishmania* e sua obtenção pelos parasitos ainda são pouco compreendidos, é possível que existam diversas

outras estratégias, por parte do organismo hospedeiro e dos microrganismos invasores, influentes na interface "parasito-hospedeiro". Nesse sentido, os estudos envolvendo essa temática são importantes uma vez que podem ajudar na superação de muitos desafios pertinentes às leishmanioses e até mesmo na instituição de medidas preventivas e terapêuticas precoces.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C.M., et al. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 15-16, Jan/Feb. 1998.
- ALTET, L., et al. Mapping and sequencing of canine *Nramp1* gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 70, n.6, p. 2763-2771, Jun. 2002.
- ASHFORD, R.W.; DESJEUX, P.; DERAADT, R.P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, London, v. 8, n. 3, p. 104-105, Mar. 1992.
- BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PEÑERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive a review. *Nutrition Reviews*, Boston, v. 54, n. 10, p. 295-317, Oct. 1996.
- BLACKWELL, J. M. et. al. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the *Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1* gene story. *Immunology Letters*, Berlin, v. 85, n. 2, p. 197-203, Jan. 2003.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, Melbourne, v. 28, n. 1, p. 121-134, Jan. 1998.
- BOYER, E., et al. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 70, n.11, p. 6032-6042, Nov. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BRICKS, L.F. Ferro e infecções: atualização. *Pediatria*, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 34-43, set. 1994.
- BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, Omaha, v. 1, n. 8, p. 457-467, Jul. 2001.
- BUENO, R. *Estudo do gene Nramp1 canino em macrófagos infectados com Leishmania chagasi*. 2006.105F. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- CALDAS, J. M., et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection on childhood from endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luís-MA, island. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 445-451, Sept/Oct. 2001.
- CELLIER, M., et al. Expression of the human *Nramp1* gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *Journal of Leukocyte Biology*, Denver, v. 61, n. 1, p. 96-105, Jan. 1997.
- CHANG, K.P. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *International Review of Cytology Supplement*, New York, v. 14, p. 267-305, 1983.
- CLEMENS, D.L.; HORWITZ, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 181, n. 1, p. 257-270, Jan. 1995.
- COOK, J. D.; BAYNES, R. D.; SKIKNE, B. S. Iron deficiency and the measurement of iron status. *Nutrition Research Reviews*, London, v. 5, n. 1, p. 189-202, Jan. 1992.
- CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). *O Hospital (Rio de Janeiro)*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 5-9, 1937.
- CUNHA, S., et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 89, n. 2, p. 155-158, Mar/Apr. 1995.

- DELGADO, O. et al. The re-emergence of american visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela: present situation of human and canine infections. *Parasite*, Paris, v. 5, n. 4, p. 317-323, Dec. 1998.
- DHUR, A.; GALAN, P.; HERCBERG, S. Iron status, immune capacity and resistance to infections. *Comparative Biochemistry and Physiology A., Comparative Physiology*, New York, v. 94, n. 1, p. 11-19, 1989.
- DOMINGUEZ, M. et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes and Infection*, Berlin, v. 5, n. 6, p. 507-513, May. 2003.
- FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews. Microbiology*, London, v. 2, n. 10, p. 820-832, Oct. 2004.
- FARTHING, M. J. Iron and immunity. *Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement*, Arsta, v.361, p. 44-52, 1989.
- FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by Nramp proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, London, v. 9, n. 8, p. 397-403, Aug. 2001.
- FORBES, J. R.; GROS, P. Iron, manganese, and cobalt transport by *Nramp1 (Slc11a1)* and *Nramp2 (Slc11a2)* expressed at the plasma membrane. *Blood*, Washington DC, v. 102, n. 5, p. 1884-1892, Sept. 2003.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, Washington DC, v. 201, n. 4359, p. 875-880, Sept. 1978.
- GENETU, A. et al. *Leishmania aethiopica*: strain identification and characterization of superoxide dismutase-B genes. *Experimental Parasitology*, Herts, v. 113, n. 4, p. 221-226, Aug. 2006.
- GERMANO, R. M. A. *Disponibilidade de ferro na presença do β -caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos*. 2002. 95F. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- GETACHEW, F.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, Heidelberg, v. 154, n. 1, p. 62-69, Jul. 2007.
- GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, Sept. 2004.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, Melbourne, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, Sept. 2003.
- GRUENHEID, S.; GROS, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Current Opinion in Microbiology*, Paris, v. 3, n. 1, p. 43-48, Feb. 2000.
- GRUENHEID, S., et al. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *Journal Experimental Medicine*, New York, v. 185, n. 4, p. 717-730, Feb. 1997.
- GOVONI, G. et al. Functional expression of *Nramp1* in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 67, n. 5, p. 2225-2232, May. 1999.
- GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Stockholm, v. 1465, n. 1-2, p. 190-198, May. 2000.
- HERSHKO, C.; PETO, T. E. A.; WEATHERALL, D. J. Iron and infection. *British Medical Journal*, London, v. 296, n. 6623, p. 660-664, Mar. 1998.
- HERSHKO, C. Iron, infection, and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, London, v. 52, n. 1, p. 165-174, Feb. 1993.
- HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 28, n. 11, p. 577-588, Nov. 2006.

- HUYNH, C. et al. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 203, n. 10, p. 2363-2375, Sept. 2006.
- HUYNH, C.; ANDREWS, N.W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cellular Microbiology*, Berkeley, v. 10, n. 2, p. 293-300, Dec. 2008.
- IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, Washington DC, v. 309, n. 5733, p. 436-442, Jul. 2005.
- KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, Cambridge, v. 133, p. S87-S112, Oct. 2006.
- KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sand flies. In: LUMSDEN, W.; EVANS, D. (Ed.). *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press, 1979. p. 395.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine. Vol 1 Biology and Epidemiology*. New York: Academic Press, 1987.
- LIPOLDOVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews. Genetics*, London, v. 7, n. 4, p. 294-305, Apr. 2006.
- MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. São Paulo: Roca, 1998. p. 1179.
- MALAFIA, G. Deficiência de ferro: resistência ou susceptibilidade a infecções? *Revista Médica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 18, n. 3, p. 191-196, Jul-Set. 2008.
- MARQUIS, J.; GROS, P. Intracellular *Leishmania*: your iron or mine? *Trends in Microbiology*, v. 15, n. 3, p. 1-3, Mar. 2007.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARSDEN, P. P. Ecologia e controle de vetores: Leishmanioses. In: Encontro Nacional sobre Saúde e Meio Ambiente, 1991, Rio de Janeiro. *Anais ...* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1991, p. 31-36.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities of their control. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 359-378, Jul. 1994.
- MCMOHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for new world cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunological Reviews*, Philadelphia, v. 201, p. 206-224, 2004.
- NASCIMENTO, M. D. et al. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 29, n. 3, p. 233-240, May/Jun. 1996.
- OPPENHEIMER, S. J. Iron and infection: a clinical review. *Singapore Paediatric Society*, Singapore, v. 36, p. 1-9, 1994.
- OPPENHEIMER, S. J. Iron and infection in the tropics: pediatric clinical correlates. *Annals of Tropical Paediatrics*, Liverpool, v. 18, p. 81-87, Sept. 1998.
- OPPENHEIMER, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 131, n. 2, p. 616S-635S, Feb. 2001.
- OPPENHEIMER, S. J.; HENDRICKSE, R. G. The clinical effects of iron deficiency and iron supplementation. *Nutrition Abstracts & Reviews*. Osaka, v. 53, p. 585-598, 1983.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE . *Program for the surveillance and control of leishmaniasis*. Geneva: World Health Organization, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2008.

- PARAMCHUK, W. J. et al. Cloning, characterization and over-expression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Heidelberg, v. 90, n. 1, p. 203-221, Dec. 1997.
- PLEWES, K. A.; BARR, S. D.; GEDAMU, L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 71, n. 10, p. 5910-5920, Oct. 2003.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, Jul/Ago. 2003.
- READY, P. Sand flies evolution and its relationship to *Leishmania* transmission. *Memórias do Instituto Oswald Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 589-590, Jul/Aug. 2000.
- ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Masadilan and *Phebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 25, p. 127-134, 2003.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews. Immunology*, London, v. 2, n. 11, p. 845-858, Nov. 2002.
- SANCHEZ-ROBERT, E., et al. Polymorphism of *Slc11A1 (Nramp1)* gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *The Journal of Heredity*, Oxford, v. 96, n. 7, p. 755-58, 2005.
- SCRIMSHAW, N. S.; SAN GIOVANNI, J. P. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 66, n. 2, p. 464-477, Aug. 1997.
- SILVA, A. C.; GOMES, A. C. Study of the vectorial competence of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) for *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, Vianna, 1911. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 187-191, Mar/Apr. 2001.
- STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Critical Reviews in Microbiology*, London, v. 28, n. 3, p. 187-248. Jul. 2002.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, London, v. 85, p. 138-147, Dec. 2007.
- TRAVI, B. L. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 92, n. 3, p. 275-278, May/Jun. 1998.
- VAN DER VEEN, R. C. et al. Antigen presentation to Th1 but not Th2 cells by macrophages results in nitric oxide production and inhibition of T cell proliferation: interferon- γ is essential but insufficient. *Cellular Immunology*, Bethesda, v. 206, n. 2, p. 125-135, Dec. 2000.
- ZHOW, D. et al. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 67, n. 4, p. 1974-1981, Apr. 1999.
- ZWILLING, B. S. et al. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infection and Immunity*, Washington DC, v. 67, n. 3, p. 1386-92, Mar. 1999.
- WERNECK, G. L. et al. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Tropica*, Hamburg, v. 83, n. 1, p. 13-18, Jul. 2002.
- WESSLING-RESNICK, M. Iron transport. *Annual Reviews of Nutrition*, Palo Alto, v. 20, p. 129-151, Jul. 2000.
- WILSON, M. E.; BRITIGAN, B. E. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitology Today*, London, v.14, n. 9, p. 348-353, Sept. 1998.