



# ACTA

Biologica Brasiliensis

ISSN online 2596-0016

Vol. II / Nº1  
jun.2019



# ACTA BIOLOGICA BRASILIENSIA

ISSN online 2596-0016



Publicação semestral do Conselho Regional de Biologia 4ª Região -  
MG|GO|TO|DF

Av. Amazonas, 298 - 15º Andar - Centro - Belo Horizonte/MG CEP: 30.180-001

Acta Biologica Brasiliensia, Vol. 02, N° 01 junho de 2019

# ACTA BIOLOGICA BRASILIENSIA

## Editores Chefes

Afonso Pelli  
Anderson Assunção Andrade  
Evanguedes Kalapothakis  
Fagner de Souza  
Letícia da Conceição Braga  
Raphael Ferreira Almeida  
Thiago Metzker

## Editores Associados

Christiane Contigli  
João de Magalhães Lopes

Ano de início de publicação: 2018  
Periodicidade: semestral  
ISSN online 2596-0016

<http://www.crbio04.gov.br/>  
[actabiologica@crbio04.gov.br](mailto:actabiologica@crbio04.gov.br)  
Belo Horizonte/MG



**MEIO AMBIENTE & BIODIVERSIDADE**

- 5** MORCEGOS DE ITAPERUNA, NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, SUDESTE DO BRAZIL  
Felipe Santana Machado, Aloysio Souza de Moura, Bruno Senna Correa, Shayenne Elizianne Ramos, Elaine Cristina Reis Cardoso, Marco Aurélio Leite Fontes
- 16** DIETA DE *Barycholos ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937) (ANURA: CRAUGASTORIDAE) EM UMA ÁREA DE CERRADO DO BRASIL CENTRAL  
Getulio de Assis Gurgel, Gabriel de Freitas Horta, Vinícius Alves Ferreira, Eduardo Borges de Assis, Sergei Studart Quintas Filho
- 30** DIAGNÓSTICO E ANÁLISE DE NASCENTES LOCALIZADAS NA PARTE ALTA DO MUNICÍPIO DE NANUQUE – MG  
Andreia Alves Cândido Bonfim, Analaura Vieira dos Santos, Giovanni Guimarães Landa, Rayssa Amorim Neris
- 40** AVALIAÇÃO DO USO DO CERCAMENTO COMO MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DE NASCENTES E DA QUALIDADE DOS MANANCIAIS  
Giovanni Guimarães Landa, Analaura Vieira dos Santos, Andreia Alves Cândido Bonfim, Rayssa Amorim Neris

**BIOTECNOLOGIA & PRODUÇÃO**

- 54** MARCADORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS PARA MEDICINA PERSONALIZADA DO CÂNCER COLORETAL  
Amanda Vilefort de Melo, Rafaela Marcelle Pacheco Silva, Warne Pedro Andrade, Letícia da Conceição Braga

## SAÚDE

- 80** CURRENT DRUGS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES FOR THE LEISHMANIASIS TREATMENT  
Monica Soares Costa, Débora Cristina de Oliveira Silva Nunes, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama
- 101** FARMACOTERAPIA DE PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA NA REGIÃO BRASIL CENTRAL  
Bruno Vinícius Diniz e Silva, Lorena Neves Ferreira, Jéssica Barletto de Sousa Barros, Rodrigo da Silva Santos, Angela Adamski da Silva Reis

# Morcegos de Itaperuna, norte do estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil

## *Bats from Itaperuna town, northern of Rio de Janeiro state, southeastern Brazil*

Felipe Santana Machado<sup>2\*</sup>, Aloysio Souza de Moura<sup>1</sup>, Bruno Senna Correa<sup>1</sup>, Shayenne Elizianne Ramos<sup>1</sup>, Elaine Cristina Reis Cardoso<sup>1</sup>, Marco Aurélio Leite Fontes<sup>1</sup>

1 - DCF UFLA, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG. 2 - Escola Estadual Profa. Ana Letro Staacks, Av. Sen. Milton Campos, 1 Timóteo - MG, 35180-058 epilefsama@hotmail.com

### ABSTRACT

The bat fauna from Rio de Janeiro State still exists gaps in knowledge, mainly to North of the State. This article attempts to fill this gap and increases some species to the State's final list. For the capture, mist nets were armed with the aid of aluminum stakes at different sampling points at ground level. For each night of capture, six to eight nets were stretched at dusk and collected after around four hours. The choice of the dimension and the quantity of nets was dependent on the conditions of the sampled site. In addition, an active search was carried out in places that could possibly be used as shelters for bat colonies. Were found 12 species, inserted in three families: Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, and five subfamilies: Carollinae (two species), Desmodontinae (1), Glossophaginae (1), Stenodermatinae (4); Vespertilionidae (1), Phyllostominae (1), and Molossidae (2). Most of the recorded Chiroptera species in this study present a wide geographic distribution, occurring also in other Brazilian biomes. There are 77 species of bats to Rio de Janeiro State, and our study found which represents only 16.88% of the diversity from Rio de Janeiro. According to the richness estimator, 70.92% of the diversity was found. These values demonstrate how diversity may be even higher than that found in this study. However it is still believed that these values are far below reality. The reduced richness wasn't expected, because the areas are next to wildlife reserve areas as APA *Bacia do Rio São João*, *Estação Ecológica de Guaxindiba*, and National park of *Restinga de Jurubatiba*.

**KEY-WORDS.** Richness, assemblage, inventory.

### RESUMO

A fauna de morcegos no Estado do Rio de Janeiro ainda apresenta lacunas no conhecimento, principalmente para o norte do Estado. Este artigo tenta sanar essa lacuna e aumenta algumas espécies para a lista final do estado. Para a captura, redes de neblina foram armadas com o auxílio de estacas de alumínio em diferentes pontos de amostragem e no nível do solo. Para cada noite de captura, seis a oito redes foram esticadas ao anoitecer e coletadas após cerca de quatro horas. A escolha

da dimensão e quantidade de redes dependeu das condições do local amostrado. Além disso, uma busca ativa foi realizada em locais que poderiam ser usados como abrigos para colônias de morcegos. Foram encontradas 12 espécies, inseridas em três famílias: Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae e cinco subfamílias: Carollinae (duas espécies), Desmodontinae (1), Glossophaginae (1), Stenodermatinae (4); Vespertilionidae (1), Phyllostominae (1) e Molossidae (2). A maioria das espécies de Chiroptera registradas neste estudo apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo também em outros biomas brasileiros. Existem 77 espécies de morcegos no Estado do Rio de Janeiro, e nosso estudo descobriu apenas 16,88% da diversidade do estado. De acordo com o estimador de riqueza, 70,92% da diversidade foi encontrada. Esses valores demonstram como a diversidade pode ser ainda maior do que a encontrada neste estudo. No entanto, ainda acredita-se que esses valores estão muito abaixo da realidade. A reduzida riqueza não era esperada, porque as áreas estão próximas a áreas de reserva de vida selvagem, como a APA Bacia do Rio São João, a Estação Ecológica de Guaxindiba e o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.

**PALAVRAS-CHAVE.** Riqueza, assembleia, inventário.

## INTRODUCTION

The high biodiversity and the increase of anthropic actions have directed attention to tropical forests. The Atlantic Forest, which is have high diversity and a high degree of endemism<sup>(1)</sup> and considered the most complex and diverse forest, which remains only nearly 11.26% of its domain<sup>(2)</sup>.

Among the mammal groups present in the Atlantic Forest, bats are one of the three most representative<sup>(3)</sup>. They have a wide morphological variety and are important in the restoration and maintenance of native landscapes, mainly due to their different eating habits, which, combined with their high mobility capacity, make these animals large seed dispersers, plant pollinators, insects control, among others<sup>(4)</sup>.

The chiropterological fauna of the state of Rio de Janeiro is well known<sup>(5-8)</sup>. However, Bergallo et al.<sup>(9)</sup> mentioned the lack of information for mammals in the north of Rio de Janeiro, which can create conservation problems for the remaining forest fragments. Therefore, the present study has the objective to describe the richness, abundance and composition of bat assemblage from Itaperuna, north of Rio de Janeiro.

## METODOLOGY

The study was carried out in Itaperuna, northern part of the state of Rio de Janeiro, in two fragments at private non-protected area ( $21^{\circ}11'43.18''\text{S}$   $41^{\circ}51'6.36''\text{W}$  and  $21^{\circ}9'40.78''\text{S}$   $41^{\circ}54'3.09''\text{W}$ ) of ombrophilous forest of approximately 100 ha in the rural area (Figure 1). The rural zone was composed mainly by livestock, being far from the urban zone only 50 kilometers. The climate of the region according to Köppen is  $\text{Aw}^{(10)}$ , with average annual temperature of  $23^{\circ}\text{C}$  and rainfall between 1,000 and 1,200 mm annually. A total of eight nights of the collection were performed, in sequential days during the summer, and in the edge and interior of forests randomly. Priority areas were natural clearings, borders, proximity to possible natural shelters or plants with fruits and flowers that are known to attract bat species<sup>(11)</sup>.



Figura 1 - Map of study area. The star is Itaperuna Town, Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil.

For this work we obtained a collection license from IBAMA act n° 036/2012. For the capture, mist nets (12x2.5m, 7x2.5m and 4x2.5m) were armed in the form of zigzag with the aid of aluminum stakes at different sampling points and at ground level. For each night of capture, six to eight nets were stretched at dusk and collected after around four hours, normally between 18h30 to 22h30. The choice of the dimension and the quantity of nets was dependent on the conditions

of the sampled site. In addition, an active search was carried out in places that could possibly be used as shelters for bat colonies.

The taxonomic identification of the species was the Gardner identification key<sup>(12)</sup>; the external morphology was analyzed by qualitative and quantitative aspects (skin color, length total, tail presence and size, nasal leaf format)<sup>(13)</sup>. After biometry, each individual was placed in a containment bag, being released only at the end of the sampling to avoid that the same animal was retaken.

The species nomenclature and the taxonomic arrangement in the family and subfamily categories were based on Wilson and Reeder<sup>(4)</sup>, Reis et al.<sup>(14)</sup> and Gardner<sup>(12)</sup>.

## DATA ANALYSIS

The sample effort was calculated by the expression  $E = m^2 \cdot h$ <sup>(15)</sup>, in which “m<sup>2</sup>” is the number of mist nets open per night and “h” is the total number of hours of nets opened. The sampling effort module and locality are described in Table 1.

Table 1 – Sampling sites of fragments 1 and 2 in each collect day and sample effort.

Day	Fragment	Sampling Effort
1	2	960 m <sup>2</sup> h
2	2	590 m <sup>2</sup> h
3	2	960 m <sup>2</sup> h
4	2	493,75 m <sup>2</sup> h
5	1	540 m <sup>2</sup> h
6	1	1023,75 m <sup>2</sup> h
7	1	1200 m <sup>2</sup> h
8	-	3 hours

The frequency of occurrence, success of capture and the accumulation curves were obtained for the sampled bats. The curve was constructed using an abundance matrix using the EstimateS 7.5 program<sup>(16)</sup>.

## RESULTS

Fifty-five individuals were collected from 12 species, including Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, and five subfamilies: Carrollinae (two species), Desmodontinae (one specie), Glossophaginae (one specie), Stenodermatinae (four species), Vespertilionidae (one specie), Phyllostominae (one specie) and the Molossidae with two species, according to Table 2.

Table 2 – List of species and occurrence frequency of bat species from Itaperuna, Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil.

Family		Occurrence frequency
Subfamily		
Phyllostomidae		
Glossophaginae	<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	1.89
Sternodermatinae	<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	1.89
	<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	20.75
	<i>Artibeus</i> sp.	3.77
	<i>Pygoderma bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	1.89
	<i>Sturnira lilium</i> (E. Geoffroy, 1810)	11.32
Carollinae	<i>Carollia brevicauda</i> (Schinz, 1821)	3.77
	<i>Carollia perspicillata</i> (Linneus, 1758)	7.55
Desmodontinae	<i>Desmodus rotundus</i> (E. Geoffroy, 1810)	20.75
Phyllostominae	<i>Mycronycteris minuta</i> (Gervais, 1856)	1.89
Vespertilionidae		
Vespertilioninae	<i>Histiotus velatus</i> (I. Geoffroy, 1824)	1.89
Molossidae	<i>Molossus molossus</i> (Pallas, 1766)	18.87
	<i>Molossus rufus</i> E. Geoffroy, 1805	3.77
Total		100

The capture success for the two fragments was 0.15 individual/m<sup>2</sup> h. The general species accumulation curve for the two fragments did not reach asymptote, and did not show curve stabilization. The increase of the sampling effort would increase the number of recorded species. The first-order Jackknife richness estimator was outside the 95% confidence interval with 16.91 species.

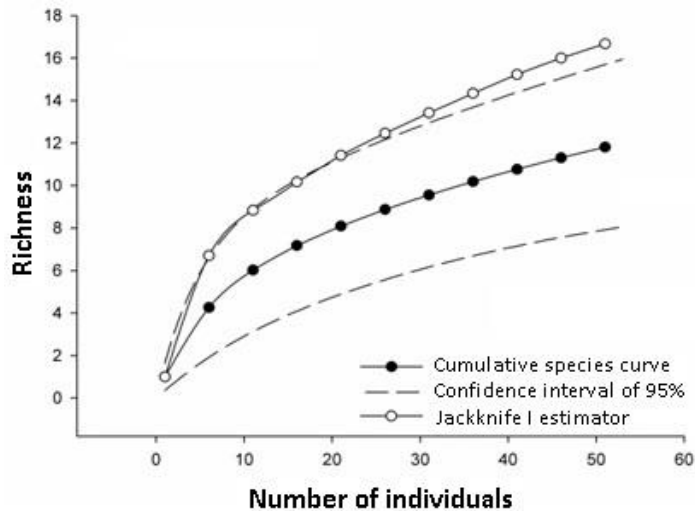


Figure1 – Cumulative species curve and Jackknife of first order estimator to fragments 1 and 2 from Itaperuna, Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil.

## DISCUSSION

Most of the recorded Chiroptera species in this study present a wide geographic distribution, occurring also in other Brazilian biomes<sup>(8)</sup> gathered all the species already found in the state of Rio de Janeiro. These authors mentioned the existence of 77 species of bats, which represents only 16.88% of the diversity from Rio de Janeiro<sup>(17,6)</sup>. According to the richness estimator, 70.92% of the diversity was found. These values demonstrate how richness may be even higher than that found in this study. However, it is still believed that these values are far below reality.

The capture success was much lower than other studies conducted in the state of Rio de Janeiro. For example, Lourenço *et al.*<sup>(7)</sup> found a capture success of 0.32 ind/ m<sup>2</sup> h, which is low compared to other studies in the state: Lourenço *et al.*<sup>(7)</sup> obtained 34 species in 3559.2 net-hour on the Island of Marambaia (RJ) and Luz *et al.*<sup>(18)</sup> obtained 30 species in 242,424 nets per hour. The main factors that contributed to this result are: the high degree of anthropization, the reduced size of

the fragment, and the high degree of slope of the area. Besides that, the Chiroptera community was sampled using mist nets<sup>(19)</sup>, which is a commonly and efficient method to capture species of the Phyllostomidae family, due to foraging habit below the canopy of trees<sup>(20)</sup>. The prominent presence of the Phyllostomidae family was expected, since the methodology employed increases the capture of this family<sup>(19)</sup>.

The capture efficiency is a relevant fact in bat fauna inventories<sup>(21)</sup> suggests the need for at least 1,000 captures to sample the diversity of phyllostomid bats in the Atlantic Forest and Esberárd and Bergallo<sup>(22)</sup> suggest a minimum of 700 captures for areas in the State of Rio de Janeiro. Taking into account that the present work obtained only 53 captures, it is understood that the diversity recorded represents a small sample of the community. The low richness was not expected, because the sampling area are relatively close to wildlife reserves such as *APA Bacia do Rio São João*, *Estação Ecológica de Guaxindiba*, and *ParNa da Restinga de Jurubatiba* (~90 km from away). These areas are some of the few well-preserved forest remnants in the State. In this way, more species were expected for the sampled areas, since bats have extensive living areas, exceeding 500 hectares<sup>(23)</sup>.

The Phyllostomidae family was the most abundant, representing 75.47% of the total number of captured individuals, covering 9 of the 13 registered species. The prevalence of this family in inventories in Brazil is common, and this result has also been observed in other studies<sup>(5, 21, 24, 6)</sup>. There is also the fact that insectivorous species, which make up most of the other families, fly higher and/or perceive the net more easily<sup>(21)</sup>, not being captured by the nets<sup>(19, 25)</sup>. In addition, this family is the most diverse and abundant in South America, presenting 150 species; and is the largest family in Brazil with 90 species<sup>(14)</sup>.

The subfamily with the largest number of species was Stenodermatinae, subfamily that also had the largest number of captured individuals. The high diversity and abundance of this subfamily in the present study may be related to the type of vegetation, with elements of Dense Ombrophylous Forest. Within this subfamily, the species with the highest number of captured individuals from the overall total was *A. lituratus*, which is one of the most well-known species in Brazil

because of its high abundance, even in urban environments<sup>(14)</sup>. This species is sheltered in the canopy of trees, under the leaves of palm trees and other plants and found in conserved environments. It is one of the best-adapted species to urban environments<sup>(26,27)</sup>.

The species *Desmodus rotundus* is strictly hematophagous, preferring blood from large mammals and the introduction of domestic animals such as horses, cattle and pigs have increased the number of individuals in the last 300 years<sup>(28)</sup>, which explains its high abundance for the study area, because the environment is basically composed of pastures. Due to its food habit and its importance in the transmission of rabies, this species is one of the most well-known and studied in the world<sup>(29)</sup>.

The other species with the greatest abundance is *Molossus molossus*, which is strictly insectivorous and can be found in urban and non-urbanized areas, occupying hollows of trees<sup>(14)</sup>. The Molossidae family is primarily recorded in inventories with the use of alternative methods such as active search. It is emphasized that this family was only registered in the study area because of the use of this methodology.

## CONCLUSION

It is concluded that the diversity found in this research is low and the result of a sample effort considered as medium when compared with other articles previously published in the state of Rio de Janeiro. However, the composition includes important species for the north of the state and due to a lack of research, the importance of such records is reiterated for a broadly anthropized region.

## REFERÊNCIAS

- (1) Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853-858. DOI: 10.1038/35002501

- (2) Ribeiro, M. C.; Metzger, J. P.; Martensen, A. C.; Ponzoni, F. J.; Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142(6): 1141-1153. DOI: 10.1016/j.biocon.2009.02.021
- (3) Paglia, A. P.; Fonseca, G. A. B.; Rylands, A. B.; Hermann, G.; Aguiar, L. M. S.; Chiarello, A. G.; Leite, Y. L. R.; Costa, L. P.; Siciliano, S.; Kierulff, M. C. M.; Mendes, S. L.; Tavares, V. C.; Mittermeier, R. A.; Patton, J. L. 2012. Annotated Checklist of Brazilian Mammals. Conservation International, Arlington, VA, USA. v. 6, 76 p.
- (4) Wilson, D. E.; Reeder, D. M. 2005. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. JHU Press.
- (5) Dias, D.; Peracchi, A. L.; Silva, S. P. 2002. Quirópteros do Parque Estadual da Pedra Branca, Rio De Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 19(2): 113-140. DOI: 10.1590/S0101-81752002000600012.
- (6) Dias, D.; Peracchi, A. L. 2008. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá, Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia* 25(2): 333-369. DOI: 10.1590/S0101-81752008000200023.
- (7) Lourenço, E. C.; Costa, L. M.; Silva, R. M.; Esbérard, C. E. L. 2010. Batdiversity of Ilha da Marombaia, Southern Rio de Janeiro State, Brazil (Chiroptera, Mammalia). *Brazilian Journal of Biology* 70: 511-519. DOI: 10.1590/S1519-69842010000300007
- (8) Peracchi, A. L.; Nogueira, M. R. 2010. Lista anotada dos morcegos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Chiroptera Neotropical* 16: 508-519.
- (9) Bergallo, H. G.; Fidalgo, E.C.C.; Rocha, C. F. D.; Uzeda, M. C.; Costa, M. B.; Alves, M. A. S.; Van Sluys, M.; Santos, M. A.; Costa, T.C.C.; Cozzolino, A. C. R. 2009. Estratégias e ações para a conservação da biodiversidade no Estado do Rio de Janeiro. 1. Ed. Rio de Janeiro: *Instituto Biomas*. v. 1. 344 p.
- (10) Alvares, C. A.; Stape, J. L.; Sentelhas, P. C.; Gonçalves, J. L. M.; Sparovek, G. 2013. Climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift Journal* 22(6): 711-728. DOI: 10.1127/0941-2948/2013/0507
- (11) Wilson, D. E.; Cole, F. R.; Nichols, J. D.; Rudran, R.; Foster, M. S. 1996. Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard methods for Mammals. Smithsonian Institution Press, Washington, 409 p.

- (12) Gardner, A. L. 2008. Mammals of South America, marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. University of Chicago Press, Chicago, v. 1, 669 p.
- (13) Vizotto, L. D.; Taddei, V. A. 1973. Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. Editora da Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto.
- (14) Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Pedro, W. A.; Lima, I. P. 2006. Mamíferos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 437 p.
- (15) Straube, F. C.; Bianconi, G. V. 2002. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com a utilização de redes-de-neblina. Chiroptera Neotropical 8(1-2):150-152.
- (16) Colwell, R. K. 2006. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from simples, version 8.0. <<http://purl.oclc.org/estimates>>, Access in 20 jan. 2018.
- (17) Esbérard, C. E. L.; Bergallo, H. G. 2005. Coletar morcegos por 6 ou 12 horas a cada noite? Revista Brasileira de Zoologia 22(4): 1095-1098. DOI: 10.1590/S0101-81752005000400039.
- (18) Luz, J. L., Costa, L. D. M., Lourenço, E. C.; Esbérard, C. E. L. 2011. Bats (Mammalia, Chiroptera) from Reserva Rio das Pedras, Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. Biota Neotropica 11: 95-101. DOI: 10.1590/S1676-06032011000100009
- (19) Voss, R. S.; Emmons, L.H. Mammalian diversity in Neotropical lowland rainforest: a preliminary assessment. Bulletim of American Museum of Natural History 230: 1996, 115p.
- (20) Kalko, E. K. V. 1998. Organization and diversity of tropical bat communities through space and time. Zoology.101(4): 281-297.
- (21) Bergallo, H. G.; Esbérard, C. E. L.; Mello, M. A. R.; Lins, V.; Mangolin, R.; Melo, G. G. S.; Baptista, M. 2003. Bat species richness in Atlantic Forest: what is the minimum sampling effort? Biotropica 35(2): 278-288. DOI: doi.org/10.1646/02033
- (22) Esbérard, C. E. L.; Bergallo, H. G. 2008. Influência do esforço amostral na riqueza de espécies de morcegos no sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 25: 67-73. DOI: 10.1590/S0101-81752008000100010.

- (23) Estrada, A.; Coates-Estrada, R. 2001. Bat species richness in live fences and in corridors of residual rain forest vegetation at Los Tuxtlas, Mexico. Ecography 24(1): 94-102. DOI: 10.1034/j.1600-0587.2001.240111.x
- (24) Moratelli, R.; Peracchi, A. L. Morcegos (Mammalia, Chiroptera) do parque nacional da serra dos órgãos. In: Cronemberger, C.; Castro, E. B. V. Ciência e conservação na Serra dos Órgãos. Brasília: Ibama, 2007. 1: 193-209.
- (25) Pacheco, S. M. 2005. Técnicas de campo empregadas no estudo de quirópteros. Cadernos La Salle 1(1): 193-205.
- (26) Zortéa, M.; Chiarello, A. G. 1994. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in an Urban Reserve of South-east Brazil. Mammalia 58(4): 665-670.
- (27) Bredt, A.; Uieda, U. 1996. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, Mid-western Brazil. Chiroptera Neotropical. 2 (2): 54-57.
- (28) Altringham, J. D. 1996. Bats: biology and behaviour. Oxford University Press, Oxford. 262 p.
- (29) Bernard, E. Morcegos vampiros - sangue, raiva e preconceito. Ciência Hoje 36: 44-49, 2005.

# DIETA DE *Barycholos ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937) (ANURA: CRAUGASTORIDAE) NO CERRADO DO BRASIL CENTRAL

## DIET OF *Barycholos ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937) (ANURA: CRAUGASTORIDAE) IN THE CERRADO, BRAZIL CENTRAL

Getulio de Assis Gurgel<sup>1\*</sup>, Gabriel de Freitas Horta<sup>1</sup>, Vinícius Alves Ferreira<sup>1</sup>, Eduardo Borges de Assis<sup>1</sup>, Sergei Studart Quintas Filho<sup>1</sup>, Renato Gomes Faria<sup>2</sup>

1 Bio Ambiental, conj 12 Bloco C sala 207, Brasília/DF

2 Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE getuliogurgelbio@gmail.com

### RESUMO

É descrita a dieta de *Barycholos ternetzi*, anfíbio anuro endêmico do bioma Cerrado, baseado no conteúdo estomacal de 24 espécimes procedentes da Fazenda Portal do Céu no município do Novo Gama, GO. Os indivíduos foram coletados entre os meses de abril e outubro de 2006. O conteúdo estomacal analisado constituiu-se de 228 itens alimentares, pertencentes a 13 categorias. Material vegetal (83,33%), Formicidae (66,66%) e Coleoptera (45,83%) foram os itens mais frequentes. Numericamente os itens mais encontrados foram Isoptera e Formicidae com 35,96% e 32,89%, respectivamente. Blattaria (53,73%) foi o mais representativo em termos de volume. As larguras de nicho trófico para número e volume de presas foram respectivamente 3,95 e 2,91. Os itens de maior valor de importância foram Material Vegetal (46,05%), Formicidae (34,60%), Blattaria (30,19%) e Isoptera (29,79%). A análise da dieta de *B. ternetzi* é um importante componente de sua história natural, esclarecendo muitas de suas interações ecológicas, contribuindo para a conservação e preservação da espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amphibia, conteúdo estomacal, invertebrados.

### ABSTRACT

The diet of *Barycholos ternetzi* is described based on the stomach contents of 24 species from Fazenda Portal do Céu in the municipality of Novo Gama, GO. The individuals were collected between april and october 2006. The analyzed stomach contents consisted of 228 food items, belonging to 13 categories. Plant material (83.33%), Formicidae (66.66%) and Coleoptera (45.83%) were the most frequent items. Numerically the most found items were Isoptera and Formicidae with 35.96% and 32.89%, respectively. Blattaria (53.73%) was the most representative in terms of volume. The trophic niche widths for number and volume of prey were respectively 3.95 and 2.91. The most important items of importance were Plant Material (46.05%), Formicidae (34.60%), Blattaria (30.19%) and Isoptera (29.79%). The analysis of the diet of *B. ternetzi* is an important component of its natural history, clarifying many of its ecological interactions, contributing to the conservation and preservation of the species.

**KEYWORDS:** Amphibia, stomach contentes, invertebrates.



## INTRODUÇÃO

Os anfíbios compõem um grupo proeminente em quase todas as comunidades terrestres, ocupando uma ampla distribuição geográfica. São reconhecidas quase 8.000 espécies no mundo (Amphibia – 7992sp.), distribuídas nas ordens Anura (88%), Caudata (9%) e Gymnophiona (3%)<sup>(1)</sup>. O Brasil é o detentor da maior diversidade de anfíbios do planeta<sup>1,2,3,4</sup>. Na lista oficial da Sociedade Brasileira de Herpetologia<sup>(5)</sup>, constam 1080 espécies ocorrentes no território brasileiro, sendo a ordem Anura a mais representativa com 1039 espécies; seguidas das ordens Caudata com cinco espécies e Gymnophiona com 36 espécies<sup>(6)</sup>. Para o Cerrado brasileiro são reconhecidas 211 espécies de anfíbios anuros, com 108 endêmicas (51,1%)<sup>(7)</sup> e duas espécies de Gimnofionos<sup>(8)</sup>.

Os anfíbios dependem de áreas alagadas ou úmidas e de modo geral, estão ativos no período noturno, devido às suas características ecológicas, fisiológicas e reprodutivas<sup>(9)</sup>. A reprodução tende a ocorrer em épocas restritas do ano, condicionadas pelas chuvas e temperatura<sup>(10)</sup>. Para a maioria das espécies de anuros do Cerrado, a reprodução ocorre, normalmente, nos meses mais quentes e chuvosos<sup>(11)</sup>.

A análise da dieta de um ser vivo é um importante componente de sua história natural, esclarecendo muitas de suas interações ecológicas<sup>12,13</sup> e está associada diretamente a aspectos morfológicos e fisiológicos, contribuindo para a localização e captura de itens alimentares adequados<sup>(14)</sup>. De um modo geral os pequenos invertebrados formam a base da alimentação da maioria dos anfíbios, principalmente insetos, mas outras categorias, como a de pequenos vertebrados também já foram verificados em conteúdos estomacais de anuros<sup>14,15,16</sup>. Devido a este fato, a maioria dos anfíbios anuros são considerados como espécies generalistas e oportunistas<sup>(17)</sup>.

*Barycholos ternetzi*<sup>(18)</sup> (Figura 1) é um anuro endêmico do Cerrado, encontrado no território brasileiro nos estados de Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo e Distrito Federal<sup>1,19</sup>. Ao longo do tempo sua classificação taxonômica passou por diversos gêneros, *Paludicola* por Miranda–Ribeiro<sup>(18)</sup>; *Physalaemus* por Bokermann<sup>(9)</sup> e Lynch<sup>(20)</sup>, e por fim o gênero *Barycholos* por

Lynch<sup>19,21</sup>. Foi considerado sinônimo de *Barycholos savagei*<sup>(21)</sup> por Caramaschi e Pombal Jr.<sup>(19)</sup>. Atualmente pertence a família Craugastoridae e possui um único congênere, *Barycholos pulcher* ocorrente apenas nas planícies do Equador<sup>(22)</sup>. É comumente encontrado em ambientes florestais, tais como matas de galerias e matas mesófilas<sup>(19)</sup> e possui hábitos preferencialmente noturnos.



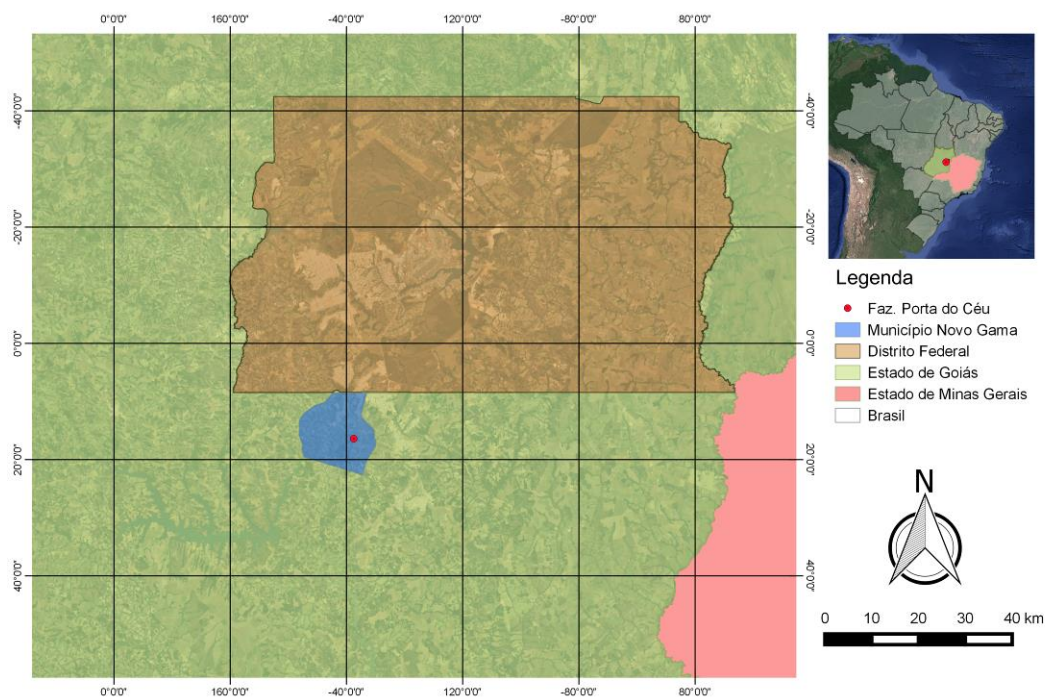
**Figura 1** – Exemplar de *Barycholos ternetzi* (Miranda-Ribeiro, 1937); Anura, Craugastoridae.

A espécie em questão difere da maioria dos anfíbios anuros por possuir desenvolvimento direto e cuidado paternal<sup>(19)</sup>. Seus ovos e as estratégias reprodutivas também apresentam diferenciações das demais espécies, constituídos por duas membranas que se aderem em grupos de três ou quatro, envoltas por partículas do solo, primordialmente utilizadas para a proteção contra dessecação e também utilizada como camuflagem<sup>23,24</sup>.

Estudos sobre história natural de anfíbios do Cerrado ainda são muito escassos, isto faz com que estudos a respeito da biologia de anfíbios sejam essenciais para fornecer informações para preservação e conservação das espécies, ameaçadas pela crescente alteração e fragmentação de habitats do Cerrado<sup>(25)</sup>, principalmente se tratando de espécies endêmicas do bioma. Com isso, nosso objetivo é investigar a composição da dieta de *B. ternetzi* em uma área de Cerrado no Brasil central a fim de fornecer dados sobre sua ecologia e estratégias alimentares, fornecendo informações sobre a história natural e contribuindo para a conservação e preservação da espécie.

## METODOLOGIA

A população de *B. ternetzi* foi estudada em uma área de Cerrado do Brasil central, na Fazenda Portal do Céu, localizada na zona rural do município Novo Gama, estado de Goiás (16°08'10.44" S; 48°02'44.88" O), distante 70 km de Brasília, Distrito federal (Figura 2). A vegetação predominante é típica de Cerrado, constituindo um mosaico vegetacional com fitofisionomias de ambientes abertos e florestais (campos, cerrados, veredas, matas de galeria, matas secas e matas mesófilas). Áreas antrópicas estão presentes na forma de pastagens e lagoas, provenientes do represamento de cursos hídricos, todos pertencentes à bacia hidrográfica do rio Corumbá.



**Figura 2** – Localização da Fazenda Portal do Céu, Município do Novo Gama – GO, Brasil.

A coleta de dados foi realizada semanalmente entre os meses de abril e outubro de 2006, com permanência em campo de dois dias e duas noites, totalizando 62 dias de trabalho com o esforço amostral de 1488 horas. Para a captura dos espécimes foi

utilizado o método de coleta ativa<sup>(26)</sup>, principalmente no período de maior atividade de *B. ternetzi*, das 18h às 6h. As coletas ocorreram principalmente em habitats preferências da espécie, ambientes florestais, entretanto, incursões em ambientes abertos de cerrado também foram realizadas. As coletas foram permitidas pela licença nº 02010.000583/2006-89, cedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

Cada animal capturado foi sacrificado com Lidocaina 2%, fixados em formalina 10% e conservados em álcool 70%. Posteriormente os animais foram abertos com um corte longitudinal e os estômagos removidos. O conteúdo estomacal foi submerso em NaOH 0,5%, promovendo a dissociação da matéria orgânica fixada, deixando livres os restos de invertebrados e estruturas vegetais, conseqüentemente foi adicionado ácido acético 1% para neutralizar as amostras.

As presas foram contabilizadas e identificadas até a menor categoria taxonômica possível. Comprimento e largura das presas foram medidas com aproximação de 0,01 milímetros, utilizando paquímetro digital.

O volume das presas foi estimado pela fórmula do elipsoide<sup>(27)</sup> e foram calculadas porcentagens numéricas e volumétricas para cada categoria de presa.

$$V = \frac{4}{3} \pi \left( \frac{l}{2} \right)^2 \left( \frac{c}{2} \right)$$

onde “l” é a maior largura e “c” o maior comprimento da presa.

A amplitude do nicho trófico (B) (número e volume) foi estimada pela medida de diversidade de Simpson<sup>(28)</sup>, sendo B variando de 1 (uso exclusivo de um único tipo de recurso) a n (uso de todos os tipos de recursos).

$$B = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

onde “p” é a proporção da categoria de recurso utilizada (presas, etc.) e “i” e “n” correspondem ao número de categorias do recurso.

Também foi calculado o Índice de Valor de Importância (IVI), com base na média da soma das porcentagens de frequência, objetivando verificar a contribuição que cada item possui na dieta.

$$IVI = \frac{(F\% + N\% + V\%)}{3}$$

Onde “F” é a frequência, “N” o número e “V” o volume das presas utilizadas, todos em porcentagem.

Todos os indivíduos foram depositados na Coleção de Herpetologia da Universidade de Brasília (CHUNB).

## RESULTADOS

O esforço amostral totalizou 62 dias de trabalho e 1488 horas, o que resultou em 24 espécimes de *B. ternetzi*, na proporção de 12 machos e 12 fêmeas. Dos 24 estômagos analisados, apenas dois estavam vazios.

O conteúdo estomacal analisado constituiu-se de 228 itens alimentares, pertencentes a 13 categorias de presas, incluindo a categoria de material vegetal. Esta foi encontrada em 20 indivíduos (83,33%), as outras categorias mais frequentes foram Formicidae (66,66%), Coleoptera (45,83%), Blattaria (33,33%) e Isoptera (33,33%). Os itens alimentares numericamente mais encontrados foram Isoptera e Formicidae com 35,96% e 32,89%, respectivamente. Insetos da ordem Blattaria (53,73%) foram os mais representativos em termos de volume. As larguras de nicho trófico para número e volume de presas foram respectivamente 3,95 e 2,91. Os itens de maior valor de importância (IVI) foram Material Vegetal (46,05%), Formicidae (34,60%), Blattaria (30,19%) e Isoptera (29,79%) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Dieta de *Barycholos ternetzi* da fazenda Porta do Céu, Novo Gama – GO.

Categoria de presas	F	F (%)	N	N (%)	V (mm <sup>3</sup> )	V (%)	IVI
Acarina	2	8,33	2	0,88			4,61
Aranae	3	12,50	6	2,63	51,57	3,51	6,21
Blattaria	8	33,33	8	3,51	788,87	53,73	30,19
Coleoptera	11	45,83	15	6,58	37,43	2,55	18,32
Diptera	1	4,16	1	0,44			2,30
Hymenoptera							
Formicidae	16	66,66	75	32,89	62,18	4,23	34,60
Outros	6	25,00	7	3,07	140,69	9,58	12,55
Hemiptera							
Outros	4	16,66	4	1,75	38,57	2,63	7,01
Auchenorrhyncha	2	8,33	2	0,88	2,01	0,14	3,11
Isoptera	8	33,33	82	35,96	294,69	20,07	29,79
Larva de inseto	2	8,33	2	0,88	13,73	0,93	3,38
Orthoptera	4	16,66	4	1,75	38,51	2,62	7,01
Material vegetal	20	83,33	20	8,77			46,05
TOTAL			228		1468,23		
B			3,95		2,91		

Legenda: F – Frequência, N – Número; V – Volume; IVI – Índice de Valor de Importância.

## DISCUSSÃO

Anfíbios são considerados forrageadores oportunistas, refletindo em sua dieta a relativa abundância de presas no ambiente dependendo da disponibilidade de itens e dos tamanhos apropriados, porém alguns anuros apresentam poucos itens compondo sua dieta podendo apresentar-se mais especialistas<sup>(29)</sup>. Fatores como sazonalidade, pluviosidade, palatabilidade, valor nutritivo, presença ou ausência de competidores, ontogenia, morfologia, movimento das presas, são também importantes na determinação da composição da dieta dos anuros<sup>(29)</sup>.

*B. ternetzi* apresentou uma dieta baseada em artrópodes, principalmente insetos e uma quantidade considerável de material vegetal. A estratégia de forrageamento adotada pela espécie é do tipo senta-espera, o que proporciona uma dieta generalista e oportunista, limitada por constrangimentos morfológicos e pela disponibilidade de presas no ambiente.

A presença de material vegetal no estômago de anuros é normalmente associada a ingestão ocasional e acidental<sup>(17)</sup>, neste caso ocorrendo a ingestão no momento da captura das presas<sup>12,30,31,32</sup>. Devido ao fato de ser uma espécie terrícola e forragear no solo, a ingestão de material vegetal é mais comum, explicando a frequência e a quantidade de material vegetal encontrado nos estômagos. Casos semelhantes podem ser observados em trabalhos conduzidos na mesma localidade com duas espécies de Leptodactylidae<sup>(33)</sup> e com *Rhinella schineirderi*<sup>(34)</sup>. Ambos trabalhos descreveram a dieta de espécies com hábito terrícola de forrageamento e em todos os trabalhos foram encontrados material vegetal compondo a dieta. Para *Leptodactylus mystacinus* uma alta frequência de material vegetal foi encontrada, chegando a 48% nos machos. Indivíduos machos de *Leptodactylus fuscus* também ingeriram material vegetal, mas com menor frequência (15%)<sup>(33)</sup>. Na dieta de *Rhinella schineideri*, também foi encontrado material vegetal, no entanto com uma frequência menor e IVI inferior, 13.2% e 4,4% respectivamente<sup>(34)</sup>.

A hipótese de que a ingestão de plantas por anuros ocorre ativamente não é descartada. Da Silva e De Brito-Pereira<sup>(35)</sup> relatam que algumas espécies de anuros são reconhecidas por incluir ativamente material vegetal em sua dieta. Desse modo, tanto as espécies acima citadas quanto *B. ternetzi* podem se utilizar desse recurso para se beneficiar no processo de digestão. Anderson, Haukos e Anderson<sup>(13)</sup> sugerem que a ingestão de material vegetal favorece a digestão e eliminação de restos de exoesqueletos bem como parasitas intestinais, e ainda acreditam que esse item alimentar pode ter importância nutricional na dieta, contribuindo como uma fonte extra de água. No caso de *B. ternetzi*, considerando a grande quantidade de material vegetal e sua importância, mais estudos a respeito do tema devem ser realizados.

O hábito de forragear no solo também define a composição de artrópodes que foram consumidos. Insetos da família Formicidae e Isoptera são em sua maioria ápteros, com exceção das castas reprodutivas, sendo predominantemente encontrados no solo. Tais grupos também são comumente encontrados no Cerrado, com elevada abundância e diversidade.

O mesmo ocorre quando se observa a alta frequência de insetos da ordem Coleoptera encontrados nos estômagos, a ordem possui uma das maiores diversidades e abundância de espécies dentre os insetos, o que aumenta a probabilidade de captura desse grupo. Formigas e besouros são conhecidos como os principais itens alimentares na dieta de anuros, justamente porque são as presas mais frequentemente encontradas em todo mundo<sup>(36)</sup>.

Insetos da ordem Blattaria também são predados com uma alta frequência, forrageiam no solo preferencialmente no período noturno<sup>(37)</sup>, momento de maior atividade de *B. ternetzi*. Além disso são insetos de maior tamanho quando comparados a formigas e cupins. Isso explica a importância volumétrica alta, e não numérica, desse grupo na dieta de *B. ternetzi*. Basicamente presas de menor tamanho como cupins e formigas são requeridos em maior quantidade e presas maiores são requeridas em menor quantidade, pois ocupam um maior volume no estômago do anuro.

Anuros tem uma maior oferta de alimentos no período crepuscular e noturno, onde suas presas (principalmente artrópodes) se encontram em maior atividade. Fato corroborado pelos únicos dois estômagos vazios, que foram retirados de espécimes coletados no período vespertino, fora do período de maior atividade de *B. ternetzi*.

As larguras de nicho trófico, tanto para número quanto para volume, podem ser utilizadas para demonstrar o quanto uma espécie é generalista ou especialista, sendo esta variando de 1 a  $n$  recursos<sup>(28)</sup>. Para *B. ternetzi*, as amplitudes de nicho (3,95 para número e 2,91 para volume) indicam que a espécie seja generalista tanto para número quanto para volume. Batista et al.<sup>(34)</sup> encontraram larguras de nicho para *Rhinella schneideri* com valores 3,3 para número e 1,6 para volume.

A composição da dieta de *B. ternetzi* é definida pela abundância e diversidade de artrópodes de solo, o que caracteriza *B. ternetzi* como uma espécie de hábito

generalista quanto aos recursos alimentares, limitado apenas por peculiaridades morfológicas. Presas maiores são requeridas em menor quantidade, enquanto presas menores em maior quantidade. Cupins, formigas, besouros e baratas compõe a base da dieta da espécie e a importância do material vegetal na dieta ainda deve ser elucidada.

Os espécimes de *Barycholos ternetzi* coletados foram depositados na Coleção Herpetológica da UNB - CHUNB, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, com os números de tombo: CHUNB65380, CHUNB65381, CHUNB65382, CHUNB65383, CHUNB65384, CHUNB65385, CHUNB65386, CHUNB65387, CHUNB65388, CHUNB65389, CHUNB65390, CHUNB65391, CHUNB65392, CHUNB65393, CHUNB65394, CHUNB65395, CHUNB65396, CHUNB65397, CHUNB65398, CHUNB65399, CHUNB65400, CHUNB65401, CHUNB65402, CHUNB65403.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos proprietários da fazenda Porta do Céu por cederem a área para a realização deste projeto, a equipe que participou do projeto, em especial os amigos: Crizanto Brito de Carvalho, Renato Batista, Wellington Coelho e Maíra Salles, e também ao professor Guarino Colli por receber os animais coletados na CHUNB.

## REFERÊNCIAS

- (1) Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference (2019). Version 6.0. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. New York, USA: American Museum of Natural History.
- (2) Bernarde, P. S. **Anfíbios e Répteis - Introdução ao Estudo da Herpetofauna Brasileira**. Curitiba, PR: Anolis Books, 2012.
- (3) Duellman, W.E. Patterns of Distribution of Amphibians: A global perspective. Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press, 1999.
- (4) Vitt, L. J.; Caldwell, J. P. Herpetology - An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. 3rd. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2009.
- (5) SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 2018.



- (6) Segalla, M. V.; Caramaschi, U.; Cruz, C. A. G.; Garcia, P. C. A.; Grant, T.; Haddad, C. F. B.; Langone, J. 2016. Brazilian Amphibians – List of Species. Disponível em <[www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)>. Acessado em 2018.
- (7) Valdujo, P. H., Silvano, D. L., Colli, G., Martins, M. 2012. Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. South American Journal of Herpetology. v. 7, p. 63–78.
- (8) Colli, G.R.; Bastos, R.P., Araujo, A.F.B. The Character and Dynamics of the Cerrado Herpetofauna. In: OLIVEIRAL, P.S., MARQUIS, R.J. (Eds.). The Cerrados of Brazil. New York: Ecology and Natural History of a Neotropical Savana. Columbia University, 2002. p.223-241.
- (9) Bokermann, W.C.A. 1966. Dos nuevas especies de *Physalaemus* de Espirito Santo, Brasil (Amphibia, Leptodactylidae). Physis, 26 (71): 193-202.
- (10) Cardoso, A. J.; Martins, J. E. 1987. Diversidade de anuros durante o turno de vocalizações, em comunidade neotropical. Papéis Avulsos do Zoológico de São Paulo, 36 (23): 279-285.
- (11) Bastos, R.P.; Motta, J.A.O.; Lima, L.P.; Guimarães, L.D. Anfíbios da Floresta Nacional de Sylvania, Estado de Goiás. Goiânia, GO. Editora: Stylo, 2003.
- (12) Anderson, M.T.; Mathis, A. 1999. Diets of two sympatric neotropical salamanders, *Bolitoglossa mexicana* and *Bufo rufescens*, with notes on reproduction for *Bufo rufescens*. Journal of Herpetology. 33: 601 – -607.
- (13) Anderson, A.M., Haukos, D.A., Anderson, J. 1999. Diet composition of three anurans from the Playa Wetlands of Northwest Texas. Copeia (2): 515-520.
- (14) Pough, F.H; Andreus, R.M; Cadle, J.E; Crumps, M.L; Savitzky, A.H., Wells, K.D. Herpetology. 3° ed., New Jersey, USA: Ed. Upper Saddle River. 2004.
- (15) Duellman, W.E.; Trueb, L. Biology of Amphibians. Baltimor, USA: The John Hopkins University Press. 1994.
- (16) Toft, C.A. 1980. Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. Oecologia. 45 (1): 131-141.
- (17) Caramaschi, U. Variação Estacional, Distribuição espacial e alimentação de populações de hílídeos na represa do rio Pardo (Botucatu, SP) (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 1981.

(18) Miranda-Ribeiro, A. 1937. Alguns batrachios novos das colleções do Museu Nacional. *O Campo*.8:66–69.

(19) Caramaschi, U.; Pombal, J.P.Jr. 2001. *Barycholos savagei*: A junior synonym of *Paludicola ternetzi*, with notes on development. *Journal of Herpetology*. 35 (2): 357-360.

(20) Lynch, J. D. 1970. Systematic status of the American leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia*: 488–496.

(21) Lynch, J. D. 1980. A new species of *Barycholos* from Estado Goiás, Brasil (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) with remarks on related genera. Paris: Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle. Section A, Zoologie, Biologie et Ecologie Animales 2: 289–302.

(22) IUCN - International Union for Conservation of Nature. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T56328A11461298.<<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T56328A11461298.en>>. Visualizado em 05 Fevereiro 2019.

(23) Pombal Jr., J. P.; Sazima, I.; Haddad, C. F. B. 1994. Breeding behavior of the pumpkin toadlet, *Brachycephalus ephippium* (Brachycephalidae). *Journal of Herpetology*. 28 (4): 516-519.

(24) Pombal Jr., J. P. 1999. Oviposição e desenvolvimento de *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (4): 967-976.

(25) Bastos, R.P. Anfíbios do Cerrado. In: NASCIMENTO, L.B., OLIVEIRA, M.E. (ed). *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte, MG: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007. p.87-100.

(26) Crump, M.L., Scott, N.J.J. Visual encounter surveys. In: HEYER, W.R., Donnelly, M.A., Mc-Diarmind, R.W., Hayek, L.C., Foster, M.S., eds. *Measuring and monitoring biological diversity: standart methods for amphibians*. Washington.: Smithsonian Institute Press, 1994. P. 84-92.

(27) Magnusson, W.E., Lima, A.P., Silva, W.A., Araujo, M.C. 2003. Use of geometric forms to estimate volume of invertebrates in ecological studies of diet overlap. *Copeia*. 2003 (1): 13-19.

(28) Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. 163: 688.

(29) Duellman, W.E.; Trueb, L. *Biology of Amphibians*. New York: Ed. McGraw-Hill, 1986.

- (30) Evans, M., Lampo, M. 1996. Diet of *Bufo marinus* in Venezuela. Jornal Herpetology. 30 (1): 73-76.
- (31) Teixeira, R.L., Schineider, J.A.P., Giovanelli, M. 1999. Diet of the toad *Bufo granulatus* (Amphibia: Bufonidae) from Sandy coastal plain in southeastern Brazil. Bol. Museu biológico Mello Leitão. 10: 29-31.
- (32) Van Sluys, M., Rocha, C.F.D., Souza, M.B. 2001. Diet, Reproduction and Density of The Leptodactylid Litter Frog *Zachaemus parvulus* in na Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. Jornal of Herpetology. 35 (2): 322-325.
- (33) De-Carvalho, C.B., Freitas, E.B., Faria, R.G., Batista, R.C., Batista, C.C., Coelho, W.A., Bocchiglieri, A. 2008. História natural de *Leptodactylus mystacinus* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) no Cerrado do Brasil central. Biota Neotropica. 8 (3): 105-115.
- (34) Batista, R.C., De-Carvalho, C.B., Freitas, E.B., Franco, S.C., Batista, C.C., Coelho, W.A., Faria, R.G. 2011. Diet of *Rhinella schneideri* (Werner, 1984) (Anura: Bufonidae) in the Cerrado, Central Brazil. Herpetology Notes. V (4): 017-021.
- (35) Da Silva, H.R.; De Britto-Pereira, M.C. 2006. How much fruit do fruit-eating frogs eat? An investigation on the diet of *Xenohyla truncata* (Lissamphibia: Anura: Hylidae). Journal of Zoology. 270 (4): 692-698.
- (36) Clarke, R.D. 1974. Food habits of toads, genus *Bufo* (Amphibia: Bufonidae). Amer. Midl. Natural. 91: 140-147.
- (37) Vianna, É. E. S.; Berne, M. E. A.; Ribeiro, P. B. 2001. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) (BLATTODEA: BLATTIDAE). Revista Brasileira de Agrociência. v.7 n. 2, p. 111-115.
- (33) Toft, C.A. 1980. Feeding ecology of thirteen syntopic species of anurans in a seasonal tropical environment. Oecologia. 45 (1): 131-141.
- (34) Valdujo, P. H., Silvano, D. L., Colli, G., Martins, M. 2012. Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. South American Journal of Herpetology. v. 7, p. 63–78.
- (35) Van Sluys, M., Rocha, C.F.D., Souza, M.B. 2001. Diet, Reproduction and Density of The Leptodactylid Litter Frog *Zachaemus parvulus* in na Atlantic Rain Forest of Southeastern Brazil. Jornal of Herpetology. 35 (2): 322-325.

(36) Vianna, É. E. S.; Berne, M. E. A.; Ribeiro, P. B. 2001. Desenvolvimento e longevidade de *Periplaneta americana* (LINNEU, 1758) (BLATTODEA: BLATTIDAE). Revista Brasileira de Agrociência. v.7 n. 2, p. 111-115.

(37) Vitt, L. J.; Caldwell, J. P. Herpetology - An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. 3rd. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2009.

# DIAGNÓSTICO E ANÁLISE DE NASCENTES LOCALIZADAS NA PARTE ALTA DO MUNICÍPIO DE NANUQUE – MG

## *DIAGNOSIS AND ANALYSIS OF NASCENTS LOCATED IN THE HIGH PART OF THE MUNICIPALITY OF NANUQUE – MG*

**Andreia Alves Cândido Bonfim\*, Analaura Vieira dos Santos, Giovanni Guimarães Landa, Rayssa Amorim Neris**

Centro Universitário de Caratinga – Campus de Nanuque. R. Nelício Cordeiro, S/N, Nanuque/MG, CEP: 39860-000 andreia.a.c.bonfim@hotmail.com

### RESUMO

O presente estudo foi realizado no município de Nanuque – MG, sendo o objetivo diagnosticar e analisar as nascentes localizadas na parte alta da cidade e classificá-la quanto a localização geográfica, o tipo de nascente, estado de conservação e seu regime de vazão em perenes, intermitentes e efêmeras. Foram realizadas visitas in loco com o intuito de obter informações da atual situação ambiental das nascentes. Foram identificadas 11 nascentes das quais 9 são consideradas perenes e 2 intermitentes. Das nascentes analisadas na área de estudo, 4 encontram-se degradadas, 6 encontram-se perturbadas e apenas 1 encontra-se em estado de conservação segundo o Código Florestal Brasileiro (Lei 12.651/2012). Constatou-se que as áreas possuem interferência antrópica, com atividade de desmatamento e pastagem, intensificando o processo de degradação. Sendo necessário ações que irão mitigar esses processos ou viabilizem a recuperação das nascentes, garantindo a produção das águas.

**PALAVRAS – CHAVE:** Diagnóstico Ambiental, Proteção de Matas Ciliares, Área de Preservação Permanente.

### ABSTRACT

The present study was carried out in the city of Nanuque, Minas Gerais State, Brazil. The objective was to diagnose and analyze the springs located in the upper part of the city and to classify it as geographic location, spring type, conservation status and perennial flow regime, intermittent and ephemeral. On-site visits were carried out in order to obtain information on the current environmental situation of the sources. 11 springs were identified, of which 9 are considered perennial and 2 are intermittent. Of the springs analyzed in the study area, 4 are degraded, 6 are perturbed and only 1 is in a state of conservation according to the Brazilian Forest Code (Law 12.651 / 2012). It was verified that the areas have anthropic interference, with deforestation and pasture activity, intensifying the degradation process. Actions are needed that will mitigate these processes or enable recovery of the springs, guaranteeing the production of the waters.

**KEYWORDS:** Environmental Diagnosis, Riparian Forest Protection, Permanent Preservation Area.

## INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural de extrema importância para a sobrevivência do homem, mas nem sempre é possível encontrá-la disponível e de boa qualidade e sua possibilidade de uso está ficando cada vez mais prejudicada. As atividades desenvolvidas no entorno de bacias hidrográficas com avanço da urbanização, desmatamento queimadas ampliação da fronteira agrícola, utilização de agrotóxico, lançamento de efluentes domésticos e industriais são fatores que vem contribuindo para a alteração da qualidade da água e comprometendo a saúde da população bem como risco de extinção das nascentes.

A água potável acessível é relativamente escassa e está escassez está se tornando um grande problema para a humanidade. Novos desenvolvimentos visando aprimorar o controle e os conhecimentos sobre o tema, inclusive com a elaboração de nova legislação, são hoje objeto dos órgãos gestores responsáveis pela gestão dos recursos hídricos. A partir de 2014 observou-se em escala midiática a materialização da crise hídrica prevista desde a década de 90 do último século. Começaram a surgir na região sudeste e em grandes centros urbanos os primeiros grandes indícios do que se pode chamar de a maior crise hídrica do Brasil, advinda de um problema grave de seca e de gestão inadequada dos recursos naturais<sup>(1)</sup>.

A exploração inadequada dos recursos naturais de forma cada vez mais desordenada, através de atividades de desmatamentos, práticas agrícolas perniciosas, atividades extrativistas agressivas e construção indiscriminada de barramentos têm promovido inúmeros problemas ambientais, principalmente em áreas de nascentes<sup>(2)</sup>.

Entende-se por nascente o afloramento do lençol freático que vai dar origem a uma fonte de água de acúmulo (represa), ou cursos d'água (regatos, ribeirões e rios). Em virtude de seu valor inestimável dentro de uma propriedade agrícola, deve ser tratada com cuidado todo especial<sup>(3)</sup>.

As nascentes e quaisquer cursos d'água são protegidos por lei, independentemente de sua localização, sendo que a vegetação que se encontra no

entorno desses cursos d'água são denominadas Áreas de Preservação Permanente (APP) (BRASIL. Lei nº 12.651 de 25 de maio de 2012)<sup>(4)</sup>. O código florestal brasileiro define-se como APP as áreas protegidas, cobertas ou não por vegetação nativa, com a função de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica, a biodiversidade, facilitar o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas. Diante de sua importância para ecossistema, torna-se relevante o conhecimento das condições naturais e avaliação dos impactos no entorno das nascentes.

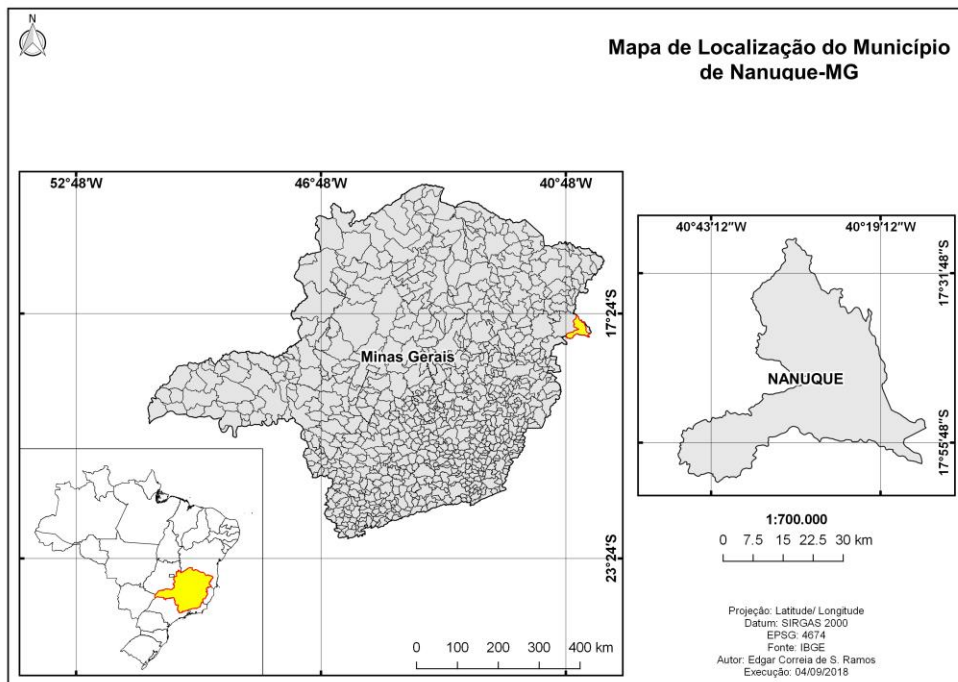
O presente estudo tem como objetivo diagnosticar e analisar as nascentes localizadas na parte alta da cidade de Nanuque - MG e classificá-la quanto à localização geográfica, o tipo de nascente, seu estado de conservação e seu regime de vazão.

## **METODOLOGIA**

### **ÁREA DE ESTUDO**

O município de Nanuque/MG (Figura 1) localiza - se na bacia do Rio Mucuri, e está inserido na bacia hidrográfica homônima limítrofe com o estado do Espírito Santo e Bahia, sendo suas coordenadas geográficas 17° 50' 21" de latitude Sul em sua interseção com o meridiano de 40° 21' 14" de longitude Oeste.

Segundo o site do IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas (2018)<sup>(5)</sup> a Bacia Hidrográfica do Rio Mucuri está inserida na mesorregião do Vale do Mucuri, onde estão municípios como Teófilo Otoni e Nanuque. Abrangendo um total de 16 municípios e apresentando uma área de drenagem de 14.640 km<sup>2</sup>, a bacia possui uma população estimada de 296.845 habitantes. O clima na bacia é considerado semi-úmido, com período seco durando de quatro a cinco meses por ano, com exceção da divisa com o Espírito Santo, onde o clima é úmido e o período seco tem duração de um a dois meses por ano.



**Figura 1** – Localização do município de Nanuque / MG (Fonte: Edgar Correia, 2019).

A economia local também se destaca pela agropecuária, o reflorestamento e o turismo, incluindo um trecho navegável de 158 km no Rio Mucuri, da cachoeira de Santa Clara até a foz, com exuberante manguezal, habitat de mariscos e crustáceos. O Rio Mucuri possuía uma exuberante vegetação da Mata Atlântica, sendo um dos principais elementos naturais de atração socioeconômica que favoreceram a ocupação da área, porém este desmatamento ocorreu de forma desordenada prejudicando assim os recursos hídricos<sup>(6)</sup>.

#### ANÁLISE E MAPEAMENTO DAS ÁREAS

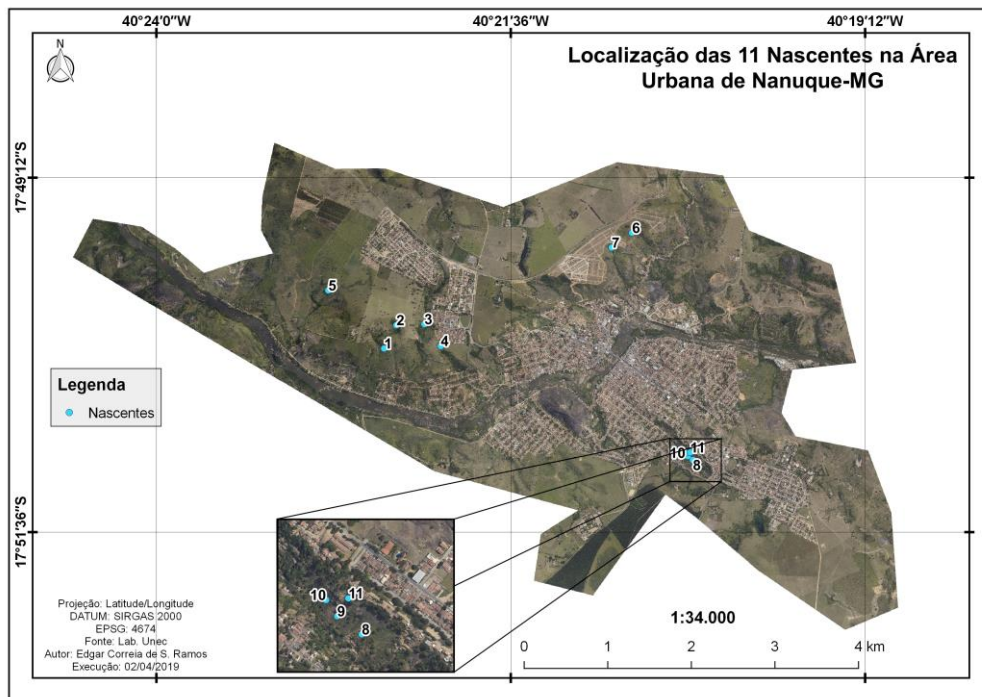
As nascentes estudadas estão localizadas na cidade de Nanuque – MG situada na bacia Hidrográfica do Rio Mucuri. Este estudo ocorreu nos meses de fevereiro a abril de 2017. Para a realização do presente artigo foi utilizado um GPS (Sistema de Posicionamento Global) modelo Garmin para localizar cada nascente em campo. Foram realizados registros fotográficos com uma câmera do modelo Samsung ES80, além de trena para medir o raio de vegetação ao redor de cada nascente. Foi utilizado o software *Google Earth Pro* para identificação dos pontos das nascentes.

Foram identificadas 11 nascentes (Figura 2) *in loco*, sendo algumas delas de difícil acesso, devido a declividade ou a vegetação alta no local, impedindo assim a aproximação.

De posse desses resultados foi possível classificar as nascentes quanto ao seu estado de preservação. Para classificar as nascentes quanto seu ao regime de vazão e o tipo de reservatório, foi utilizado critérios, segundo Borges (2008)<sup>7</sup>, do seguinte modo:

Classificação quanto ao regime de vazão:

- Nascentes perenes - fluxo de água contínuo e constante durante todo ano, inclusive na seca;
- Nascentes intermitentes- Fluem durante a estação chuvosa, mas secam durante a estação seca;
- Nascentes efêmeras - afloração durante uma chuva, com duração de alguns dias ou horas.



**Figura 2** – Localização das nascentes encontradas *in loco*, no Município de Nanuque – MG, no período de fevereiro a abril do ano de 2017. (Edgar Correia, 2019).

Classificação quanto ao tipo de reservatório:

- De encosta ou pontual - surgem em decorrência da inclinação da camada impermeável ser menor que a da encosta, ocorrendo o fluxo d'água em único ponto do terreno;
- De depressão ou difuso - a camada impermeável fica próxima à superfície do terreno, apresentando vários olhos d'água.

Para analisar as nascentes quanto ao seu estado de conservação usou os critérios estabelecidos por Pinto et al. (2005)<sup>8</sup> como segue:

- Nascentes conservadas: Apresentam pelo menos 50 metros de vegetação natural ao seu redor e não apresentam sinais de perturbação ou degradação;
- Nascentes perturbadas: Aquelas que não possuem 50 metros de vegetação natural no seu entorno, mas exibem bom estado de conservação; e
- Nascentes degradadas: Aquelas que se encontram com alto grau de perturbação, muito pouco vegetadas, solo compactado, e com erosões.

#### AVALIAÇÃO AMBIENTAL DAS NASCENTES

A avaliação da situação ambiental das nascentes teve como fundamentação conceitual a lei 12.651/2012 sobre o novo Código Florestal Brasileiro <sup>(4)</sup>, onde diz que em nascentes e olhos d'água, a distância mínima a ser preservada com vegetação natural é de 50m no entorno da mesma. No entanto, o que se observa na maioria das vezes é que esta distância não é respeitada, provocando assim a degradação do local.

O estudo das Áreas de Preservação Ambiental das nascentes e suas áreas de entorno foi realizado através de visitas *in loco* com o objetivo de diagnosticar o estado de conservação ambiental de cada nascente encontrada em (conservada, perturbada ou degradada).

## RESULTADOS

Dentre as nascentes analisadas, 5 localizam-se no bairro Israel Pinheiro, 4 no bairro Alziro Zarur (Rua do Riacho) e 2 no bairro Vista Linda. As mesmas foram avaliadas *in loco* e posteriormente analisadas quanto ao estado de conservação.

Foram identificadas em campo 9 nascentes perenes e 2 nascentes intermitentes, totalizando assim 11 nascentes localizadas na parte alta do município (Tabela 1). Das 11 nascentes avaliadas na área de estudo, 4 encontram-se degradadas, 6 encontram-se perturbadas, e apenas 1 encontra-se em estado de conservação segundo o Código Florestal Brasileiro (Lei 12.651/2012)<sup>4</sup>. Outro critério avaliado foi quanto ao tipo de reservatório, onde 6 nascentes distinguem-se como pontual e as demais como difusas.

As perturbações encontradas nas nascentes são em sua maioria originadas pela intervenção antrópica, como retirada da vegetação (rua do riacho) onde a população local faz uso da água.

Outro aspecto observado foi a prática de dessedentação de animais no entorno das nascentes, conforme visto em campo, onde o proprietário da fazenda coloca seus animais no entorno das nascentes.

**Tabela 1** – Análises das nascentes do município de Nanuque -MG, quanto a localização, tipo de nascente, estado de conservação e tipo de reservatório.

N	Coordenadas		Tipo <sup>1</sup>	Status <sup>2</sup>	Reservatório <sup>3</sup>
	Latitude	Longitude			
1	17°50'21.40"S	40°22'27.48"O	Perene	Perturbada	Difusa
2	17°50'11.93"S	40°22'22.48"O	Perene	Conservada	Pontual
3	17°50'11.53"S	40°22'11.11"O	Perene	Perturbada	Difusa
4	17°50'20.38"S	40°22'4.46"O	Perene	Degradada	Pontual
5	17°49'57.80"S	40°22'50.17"O	Perene	Degradada	Difusa
6	17°49'34.43"S	40°20'46.72"O	Perene	Perturbada	Difusa
7	17°49'40.11"S	40°20'55.00"O	Perene	Perturbada	Pontual
8	17°51'6.67"S	40°20'22.00"O	Perene	Perturbada	Pontual
9	17°51'5.15"S	40°20'24.05"O	Intermitente	Degradada	Difusa
10	17°51'3.79"S	40°20'24.98"O	Perene	Degradada	Pontual
11	17°51'3.65"S	40°20'23.12"O	Intermitente	Perturbada	Pontual

1 – Tipo de nascente. 2 – Estado de conservação das nascentes. 3 – Tipo de reservatório

## DISCUSSÃO

O conceito de nascentes ou seu sinônimo (fontes - como visto em diversas literaturas e glossários técnicos) tem sua definição como a descarga natural de água suficientemente grande para fluir em pequeno curso de água, ou na definição de Calheiros et al. (2004)<sup>3</sup>, que pode dar origem a uma fonte de acúmulo (represa ou regatos, ribeirões e rios). Na maioria dos casos, as nascentes têm sua origem no afloramento da superfície freática, e sua surgência pode ocorrer de várias maneiras (pontual, difusa, por veredas, entre outros meios).

A degradação das nascentes é mais comum nas áreas urbanas, tendo em vista a ocupação desordenada nesses espaços. A supressão da vegetação nas áreas de nascentes é a principal causa de degradação ambiental em áreas de recarga, sendo um dos fatores que mais aparecem em estudos de avaliação macroscópica de impactos ambientais em áreas de preservação permanente, como observado por Silva et al. (2014)<sup>(9)</sup>.

De acordo com Tundisi e Tundisi (2011)<sup>(10)</sup>, o crescimento da população urbana no Brasil promoveu um aumento considerável nas demandas hídricas, associado à expansão urbana, degradação dos mananciais, contaminação e poluição. Alterações no ciclo hidrológico, produzidas pela inadequada ocupação do espaço geram frequentes enchentes urbanas, problemas na coleta e disposição do resíduo urbano, que resultam em contaminação dos aquíferos e águas superficiais, e perdas na distribuição. A produção concentrada de efluentes aumentou extraordinariamente nos últimos 30 anos.

Segundo Oliveira Junior (2012)<sup>(11)</sup>, a população que reside nas proximidades da área de nascentes são uma das maiores responsáveis pelos danos causados ao local, desde a ocupação inadequada da área até a supressão da vegetação nativa para a implantação de pastagens e para a prática da pecuária, fato este que ocorre nas nascentes encontrada no Município de Nanuque – MG.

Belizário (2015)<sup>(12)</sup> também destaca que a degradação das nascentes é mais suscetível nas áreas urbanas, tendo em vista a forma artificial de ocupação nesses

espaços. Não somente há o desrespeito dos limites previstos na legislação como não são preservadas e conservadas as demais áreas da bacia que sofrem intensos processos de degradação e poluição.

Independentemente do tipo e do estado de conservação da nascente, o primeiro passo a ser tomado para a recuperação da mesma, é o isolamento da área num raio de 50 metros, para impedir a invasão por animais, evitando, principalmente, a compactação do solo pelo pisoteio e o comprometimento da regeneração da área<sup>(8)</sup>.

## **CONCLUSÃO**

Analisando os dados obtidos, foi possível concluir que as nascentes estão em desacordo com a Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012 que estabelece a preservação de um raio de 50 metros de vegetação natural. Das 11 nascentes encontradas na parte alta do município de Nanuque – MG, 6 encontravam-se perturbadas, 4 degradadas e somente 1 em estado de conservação. Essa situação é alarmante, pois as áreas das nascentes vêm sofrendo o processo de degradação, sendo necessário implementar projetos de recuperação e conservação de nascentes, o isolamento da área, plantio de vegetação apropriada, distribuição adequada dos diferentes usos do solo e implantação de técnicas de conservação do solo. Levando em consideração a situação atual, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos das nascentes localizadas no perímetro urbano do Município de Nanuque – MG.

## **REFERÊNCIAS**

- (1) Pena, R. F. A. "Escassez de água no Brasil"; Brasil Escola. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/geografia/escassez-água-no-brasil.htm>>. Acesso em: 10 de outubro de 2016.
- (2) Valente, O. F.; Gomes, M. A. Conservação de Nascentes: Produção de Água em Pequenas Bacias Hidrográficas. 2. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2011.

- (3) Calheiros, R. de O.; Tabai, F. C. V.; Bosquilia, S. V.; Calamari, M. Preservação e Recuperação de Nascentes, Comitê de Bacias Hidrográficas do Piracicaba, Capivari, Jundiá, Piracicaba, 2004.
- (4) BRASIL. Lei no 12.651, de 25 de maio de 2012. Novo Código Florestal Brasileiro. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2012.
- (5) IGAM. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Disponível em <<http://www.igam.mg.gov.br/component/content/158?task=view>> acessado em 16 de junho as 20:00.
- (6) CEMIG. Companhia Energética de Minas Gerais. Disponível em <[http://www.cemig.com.br/ptbr/A\\_Cemig\\_e\\_o\\_Futuro/sustentabilidade/nossos\\_programas/ambientais/peixe\\_vivo/Paginas/bacias\\_do\\_leste.aspx](http://www.cemig.com.br/ptbr/A_Cemig_e_o_Futuro/sustentabilidade/nossos_programas/ambientais/peixe_vivo/Paginas/bacias_do_leste.aspx)> acessado em 16 de junho as 20:20.
- (7) Borges, L.A.C Aspectos técnicos e legais que fundamentam o estabelecimento das áreas de preservação permanente (APP)/Luís Antônio Coimbra Borges. Tese de Doutorado. Lavras: UFLA, 2008.
- (8) Pinto, L. V. A.; Botelho, S. A.; Oliveira-Filho, A. T. de; Davide, A. C. 2005. Estudo da vegetação como subsídios para propostas de recuperação das nascentes da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. Revista *Árvore*, Viçosa-MG, 29 (5): 775-793.
- (9) Silva, F.L.; Tavares, T.S.; Almeida, M.F.F.; Zanitti, R.; Faresi, L. Avaliação macroscópica de duas nascentes do alto Manjolinho (São Carlos, SP). In: v CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, BELO HORIZONTE, 2014, Anais. IBEAS, Belo Horizonte, p. 1-6, 2014.
- (10) Tundisi, J. G; Tundisi, T. M. Recursos Hídricos no Século XXI. São Paulo: Oficina de Textos, 2011.
- (11) Oliveira - Junior, E.F. 2012. Os impactos ambientais decorrentes da ação antrópica na nascente do rio Piauí- Riachão Dantas/SE. Revista *Eletrônica da FJAV*, 5 (7):1-17.
- (12) Belizário, W. S. 2015. Avaliação da qualidade ambiental de nascentes em áreas urbanas: um estudo sobre bacias hidrográficas do município de Aparecida de Goiânia/GO. Revista *Mirante*, 8 (1).

# **AVALIAÇÃO DO USO DO CERCAMENTO COMO MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DE NASCENTES E DA QUALIDADE DOS MANANCIAIS**

## ***EVALUATION OF THE USE OF FENCING AS A METHOD OF PRESERVATION OF SPRINGS AND QUALITY OF MANANTIALES***

**Giovanni Guimarães Landa\*, Analaura Vieira dos Santos, Andreia Alves Cândido Bonfim, Rayssa Amorim Neris**

Centro Universitário de Caratinga – Campus de Nanuque. R. Nelício Cordeiro, S/N, Nanuque/MG, CEP: 39860-000 [gioguimaraes@yahoo.com.br](mailto:gioguimaraes@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

O presente estudo foi realizado na Comunidade Pedroso, na zona rural do município de Nanuque – MG, nos meses de outubro e novembro de 2013, com o objetivo de comparar duas nascentes cercadas e duas não cercadas, quanto ao seu estado de conservação, analisando alguns parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, pH, cor, turbidez) e microbiológicos (coliformes totais, fecais e salmonela) de qualidade de água. De acordo com os resultados obtidos, as duas nascentes cercadas apresentaram melhores resultados, confirmando assim, a importância do cercamento, principalmente quando cercados 50 metros do olho d'água, conforme estabelecido pelo IEF. Mesmo assim, as quatro nascentes estão em desacordo com a legislação vigente, não apresentando condições de potabilidade, sendo, portanto, capaz de transmitir enfermidades de veiculação hídrica.

**PALAVRAS- CHAVE:** Diagnóstico Ambiental, Nascentes, Qualidade de Água.

### **ABSTRACT**

The present study was carried out in the Pedroso Community, in the rural area of the city of Nanuque - MG, in the months of October and November of 2013, with the objective of comparing two fenced springs and two unenclosed springs, regarding their conservation status, analyzing some physical-chemical parameters (dissolved oxygen, pH, color, turbidity) and microbiological (total coliforms, fecal and salmonella) of water quality. According to the results, the two fenced springs presented better results, thus confirming the importance of the enclosure, especially when surrounded 50 meters from the water eye, as established by the IEF. Even so, the four springs are in disagreement with the current legislation, not presenting conditions of potability, being, therefore, capable of transmit water-borne diseases.

**KEYWORDS:** Environmental Diagnosis, Springs, Water Quality.

## INTRODUÇÃO

A relação do ser humano na apropriação da natureza trouxe transformações significativas para o desenvolvimento econômico. A exploração dos recursos naturais em busca de atender as necessidades humanas, gerou grandes impactos ambientais negativos, alterando o ecossistema, e ocasionando várias consequências, tais como: degradação do solo, poluição dos rios, afetando a qualidade de vida da população.

A água é um recurso natural fundamental para vida na terra, tanto para sobrevivência humana quanto para o sistema produtivo. No decorrer dos anos, a retirada das matas ciliares, e o uso inadequado do solo, vem contribuindo para diminuição da quantidade e qualidade dos mananciais<sup>(1)</sup>.

Nas áreas rurais os impactos negativos sobre as nascentes são ocasionados pelas atividades agropecuárias, ocorrendo a substituição de áreas com vegetação natural e provocando a supressão da vegetação, erosão e a contaminação da água por dejetos de animais. Uma nascente ideal é aquela que fornece água de boa qualidade, abundante e contínua, situada próxima do local de uso e de cota topográfica elevada, possibilitando sua distribuição por gravidade, sem o gasto de energia<sup>(2)</sup>.

As nascentes podem ser classificadas quanto a sua origem, segundo Valente e Gomes (2011)<sup>3</sup>, quando acontece o afloramento em um terreno declivoso, surgindo em um único ponto, são chamadas de nascente de encosta (sem acúmulo d'água inicial). Já as nascentes difusas podem se manifestar em pequenos vazamentos superficiais, ocasionando encharcamento no solo, com acúmulo inicial.

Castro (2007)<sup>4</sup> afirma que as nascentes podem ser classificadas quanto ao seu regime de fluxo (vazão), como: perenes, quando as nascentes se manifestam durante o ano todo, mas com vazões variando ao longo do ano; intermitentes, quando apresentam o fluxo durante a estação de chuvas e efêmeras, quando só ocorre o fluxo durante a precipitação, logo depois desaparecem.

Podem ser classificadas quanto ao seu estado de conservação <sup>(5)</sup>, em: preservada, quando apresenta pelo menos 50 metros de vegetação natural no seu entorno, medidas a partir do olho d'água em nascentes pontuais ou a partir do olho d'água principal em nascentes difusas; perturbadas, quando não apresentam 50 metros de vegetação natural no seu entorno, mas com bom estado de conservação e degradadas, quando apresentam um alto grau de perturbação, pouca vegetada, e solo compactado, devido à presença de gado.

Segundo Valente e Gomes (2005)<sup>6</sup>, as nascentes são sustentadas pelos lençóis subterrâneos, dando origem ao curso d'água. Pinto *et al.* (2005)<sup>7</sup> afirmam que a quantidade e qualidade de água das nascentes de uma bacia hidrográfica podem ser alteradas por múltiplos fatores como a declividade, o tipo e uso do solo, sobretudo nas áreas de recarga, pois influenciam no armazenamento da água subterrânea e no regime da nascente e cursos d'água. Entretanto, devem-se adotar algumas medidas para a sua conservação, sendo de extrema importância conhecer a relação entre o solo, clima e vegetação, sistema de exploração e também cumprir a legislação.

O primeiro passo indispensável para o sucesso de qualquer método de recuperação ecológica das nascentes, é o isolamento da área com cercas convencionais, restringindo assim o acesso de animais domésticos e pessoas. Recomenda-se que pelo menos o último arame (de baixo) seja liso e colocado a uns 70 cm do chão, para permitir o trânsito de animais silvestres<sup>(8)</sup>.

O isolamento da área, utilizando o cercamento visa à conservação e a restauração da área degradada, além de sua regeneração natural. As cercas são mais indicadas em áreas com atividade de pecuária, equinocultura bem como ovinocultura (cabras e bodes), evitam a invasão do local, e conseqüentemente, a compactação do solo e danos na vegetação (PROGRAMA DE FOMENTO AMBIENTAL, 2008)<sup>9</sup>. O uso da regeneração natural exige menos mão-de-obra e insumos se comparado à operação de plantio e pode reduzir significativamente o custo de estabelecimento da vegetação arbórea em áreas antropizadas<sup>(10)</sup>.

O Projeto Produção de Água/Cercamento de Nascentes realizado pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), no município de Nanuque (MG), tem como principal objetivo proteger as nascentes, com método simples, como o cercamento, proporcionando a regeneração natural da vegetação.

O objetivo deste artigo foi realizar um estudo comparativo entre 4 (quatro) nascentes, sendo duas cercadas e duas sem cercamento, na comunidade Pedroso/Nanuque (MG), avaliando o seu estado de conservação, no que diz respeito à qualidade da água, através de parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

## **METODOLOGIA**

O município de Nanuque - MG (Figura 1) localiza - se na bacia do Rio Mucuri, e está inserido na bacia hidrográfica homônima limítrofe com o estado do Espírito Santo e Bahia, sendo suas coordenadas geográficas 17° 50' 21" de latitude Sul em sua interseção com o meridiano de 40° 21' 14" de longitude Oeste. Possui como principais afluentes, o Rio Mucuri, Rio Pampam, Ribeirão das Pedras e Córrego Sete de Setembro.

Segundo o site do IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas (2018)<sup>11</sup> a Bacia Hidrográfica do Rio Mucuri está inserida na mesorregião do Vale do Mucuri, onde estão municípios como Teófilo Otoni e Nanuque. Abrangendo um total de 16 municípios e apresentando uma área de drenagem de 14.640 km<sup>2</sup>, a bacia possui uma população estimada de 296.845 habitantes. O clima na bacia é considerado semiúmido, com período seco durando de quatro a cinco meses por ano, com exceção da divisa com o Espírito Santo, onde o clima é úmido e o período seco tem duração de um a dois meses por ano. O município apresenta ainda, uma grande variedade de solos, sendo que os Latossolos Amarelos e Argissolos Amarelos, ambos distróficos e ácidos, predominam.

A economia local também se destaca pela agropecuária, o reflorestamento e o turismo, incluindo um trecho navegável de 158 km no Rio Mucuri, da cachoeira

de Santa Clara até a foz, com exuberante manguezal, habitat de mariscos e crustáceos<sup>(12)</sup>.

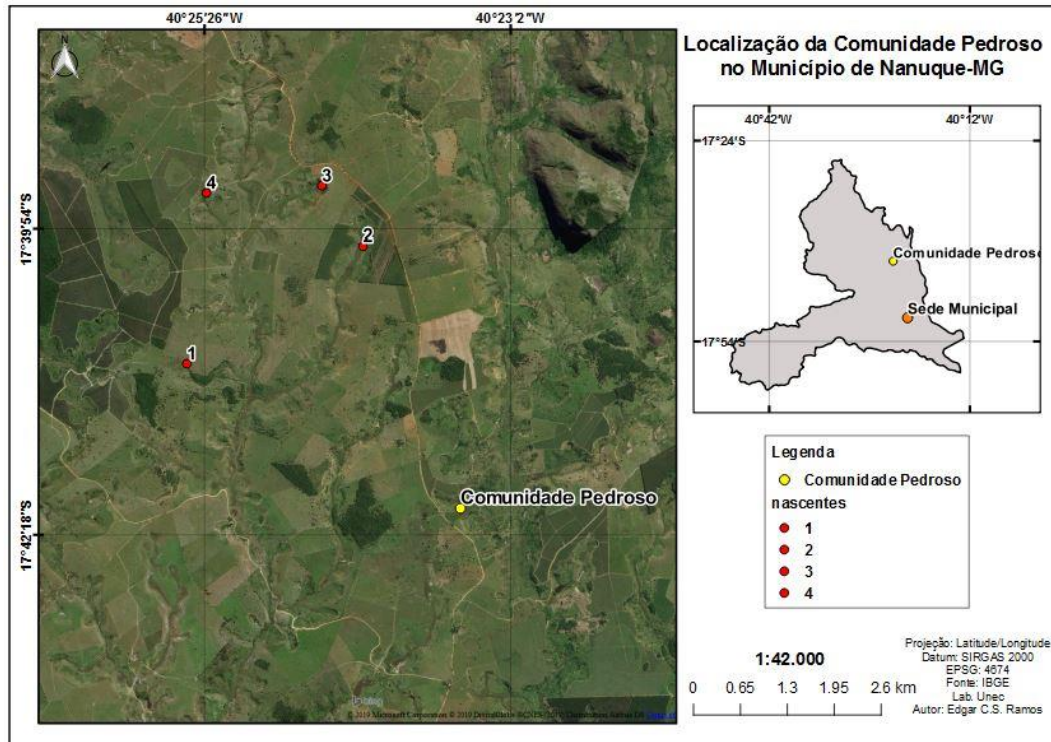


**Figura 1** – Localização do município de Nanuque – MG.

As quatro nascentes estudadas localizam-se na Comunidade Pedroso (Figura 2), zona rural do município de Nanuque (MG), próxima do Distrito de Vila Gabriel Passos. A área de estudo é ocupada em sua totalidade com atividade pastoril, por esse fato o solo se encontra em diferentes estágios de perturbação, ocasionado pela presença do gado. Dessas quatro nascentes, duas são cercadas (nascente 01 e 02) e duas não tem cercamento (nascentes 03 e 04).

#### ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Este estudo ocorreu nos meses de outubro e novembro de 2013. Foram coletadas amostras para análise de alguns parâmetros físico-químicos (oxigênio dissolvido, pH, cor, turbidez) e microbiológicos (coliformes totais, fecais e salmonela). Essas amostras foram coletadas, armazenadas e analisadas de acordo com os requisitos metodológicos para cada variável<sup>(13)</sup>, pelo Laboratório da Companhia de Saneamento de Minas Gerias – COPASA, em Nanuque.



**Figura 2** – Localização da Comunidade Pedroso e as quatro nascentes localizadas no Município de Nanuque/MG (Fonte: Edgar Correia, 2019).

## RESULTADOS

As nascentes 01 e 02 (Figuras 3 e 4) foram classificadas como nascente de encosta perene. Sendo que a nascente 01, o cercamento teve uma distância com menos de 20 metros a partir do olho d'água. Na nascente 02 o cercamento possui 50 metros a partir do olho d'água, preservando a nascente e proporcionando melhor desenvolvimento da vegetação, e nota-se na figura 6, quanto a seu estado de conservação, a nascente está preservada. A atividade desenvolvida ao redor é de pecuária.



**Figura 3** – Nascente 01 localizada na Comunidade Pedroso em Nanuque – MG.



**Figura 4** – Nascente 02 localizada na Comunidade Pedroso em Nanuque – MG.

As nascentes 03 e 04 (Figuras 5 e 6) foram classificadas como difusas perenes. Essas nascentes não são cercadas e as atividades de pecuária são predominantes no local, sendo que com o tempo elas ocasionam a compactação do solo, prejudicando o desenvolvimento da vegetação e, podendo afetar a quantidade e qualidade da água. Verifica-se na figura 05, que a nascente 03, quanto ao estado de conservação da vegetação se encontra perturbada, visto que ocorreu intervenção humana, fazendo um poço para captar a água. As atividades próximas são de pecuária, cana-de-açúcar e retirada de areia.



**Figura 5** – Nascente 03 localizada na Comunidade Pedroso em Nanuque – MG.



**Figura 6** – Nascente 04 localizada na Comunidade Pedroso em Nanuque – MG.

Foram analisadas a qualidade da água dessas quatro nascentes, através das variáveis Oxigênio Dissolvido, Turbidez, Cor e pH, e os resultados são apresentados abaixo (Tabela 01).

**Tabela 1** – Resultado das análises físico-químicas das quatro nascentes da Comunidade Pedroso, município de Nanuque/MG, nos meses de outubro e novembro de 2013.

Nascentes	Parâmetro	Valor	Portaria 2914	CONAMA 357 (Classe 2)
01	Oxigênio Dissolvido	9,0	>5 mg/L	>5 mg/L
02		9,0		
03		9,0		
04		9,0		
01	Turbidez	5,92	5 uT	< 100 UNT
02		1,99		
03		13,1		
04		25,1		
01	Cor	20	15 uH	75 mg Pt/L
02		15		
03		100		
04		100		
01	pH	6,4	6 a 9,5	6 a 9,0
02		7,8		
03		7,4		
04		7,4		

Na Tabela 2 abaixo, são apresentados os resultados das análises microbiológicas obtidos para as quatro nascentes.

**Tabela 2** – Resultado das análises microbiológicas das quatro nascentes da Comunidade Pedroso, município de Nanuque/MG, nos meses de outubro e novembro de 2013.

Nascentes	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Salmonela
01	120 UFC	840 UFC	0 UFC
02	0 UFC	360 UFC	0 UFC
03	0 UFC	720 UFC	0 UFC
04	0 UFC	900 UFC	0 UFC

## DISCUSSÕES

Em todas as nascentes verificou-se a partir dos resultados dos parâmetros físico-químicos, que de acordo com CONAMA nº 357/2005<sup>(14)</sup> estão classificadas em corpos de água de classe II, destinadas ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; proteção das comunidades aquáticas; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças e plantas frutíferas; criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana.

Para verificar os padrões de potabilidade foi utilizada a Portaria Nº 2914/2011 do Ministério da Saúde<sup>(15)</sup>. Diante dos resultados obtidos, a nascente 02 foi a única que apresentou resultados condizentes com a Portaria em questão, para os parâmetros de potabilidade analisados. E esta foi a única nascente em que o cercamento obedeceu às regras exigidas pelo Instituto Estadual de Florestas, de 50 metros a partir do olho d'água.

A nascente 01, também cercada, apresentou valores para turbidez e cor bem próximos do que preconiza a Portaria 2914/2011, mas pelo fato do cercamento ter sido de apenas 20 metros do olho d'água, não foi suficiente para uma real proteção.

Já as nascentes 03 e 04, mesmo apresentando valores dentro dos limites para potabilidade para oxigênio dissolvido e pH, apresentaram alterações significativas, ultrapassando o limite exigido pela portaria nº 2914, em relação aos parâmetros turbidez e cor. Os resultados obtidos para essas duas nascentes estão relacionados ao fato de não serem cercadas e as atividades realizadas ao redor são de pecuária.

Segundo Valente e Gomes (2011)<sup>3</sup>, com o acesso dos animais, o pisoteio torna a superfície do solo próximo às nascentes compactado, diminui sua capacidade de infiltração, ficando sujeito à erosão laminar e, conseqüentemente, provocando não só a contaminação da água por partículas do solo, turvando-a, como também, e o que é pior, provoca até mesmo soterramento da nascente. Quando a água de uma nascente se turva facilmente após uma chuva, é sinal de que há uma deficiente capacidade de infiltração da água.

Foi constatada em todas as nascentes a presença de coliformes totais, e na nascente 01 detectou também a presença de coliformes fecais. Em nenhuma das nascentes foi detectado a presença de *Salmonella*. De acordo com a Portaria 2914 do Ministério de Saúde, é estabelecido como padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano ausência de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* em 100 mL de água.

Para cada uso da água, há necessidade de que a mesma tenha uma determinada qualidade. A água para beber, por exemplo, deve obedecer a critérios mais rígidos do que a utilizada na recreação ou para irrigação<sup>(16)</sup>.

A análise microbiológica das águas é de suma importância, devido ao seu potencial patogênico. A presença de bactérias do gênero Enterobacteriaceae (coliformes) - responsáveis por variadas doenças, principalmente infecções intestinais, é relativamente comum. Já a presença da bactéria *E. coli* indica contaminação fecal, por se tratar de um coliforme termotolerante específico de intestino de animais de sangue quente<sup>(17)</sup>.

Em comunidades rurais, onde não há fornecimento de água através da rede pública, é comum a utilização de nascentes como a principal fonte de água para o consumo humano, para o uso dos animais e para a irrigação das plantações. O ponto preocupante é a interferência da qualidade da água que, em zonas rurais pode se dar por vários fatores como: “o destino ... do esgoto, o destino inadequado do lixo e a modernização da agricultura e pecuária. Estes fatores representam fontes de contaminação por pesticidas, bactérias, vírus ..., protozoários, substâncias orgânicas e inorgânicas”<sup>(18)</sup>.

Desse modo, a utilização das nascentes em questão, como fontes alternativas de água pela população rural a expõe a doenças de veiculação hídrica, pois não há conhecimento dessas populações sobre a falta de qualidade sanitária da água consumida sem nenhum tipo de tratamento associado à falsa ideia de que a água subterrânea seja potável, além da falta de condições sanitárias satisfatórias na zona rural<sup>(19)</sup>.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, ficou nítida a importância do cercamento como medida de proteção de nascentes, e principalmente, obedecendo as normas estabelecidas pelo IEF, de 50 metros a partir do olho d'água, como ocorreu com a nascente 02, que apresentou os melhores resultados.

Diante do exposto, pode-se concluir que o consumo de água das nascentes estudadas na Comunidade Pedroso, pode representar risco à saúde pública, uma vez que elevado percentual das amostras está em desacordo com a legislação vigente, não apresentando condições de potabilidade, sendo, portanto, capaz de transmitir enfermidades de veiculação hídrica.

## REFERÊNCIAS

- (1) Carvalho, S. L. Medidas que Preservam Nascentes e Mananciais. Disponível em: <<http://www.agr.feis.unesp.br/jsl01072004.php>>. Acesso em: 10 out 2013.
- (2) Calheiros, R. de O.; Bosquilia, S. V.; Tabai, F. C. V.; Calamari, M. Preservação e Recuperação das Nascentes. Piracicaba: Comitê das Bacias Hidrográficas dos Rios PCJ, CTRN, 2004, 40 p.4
- (3) Valente, O. F.; Gomes, M. A. Conservação de Nascentes: Produção de Água em Pequenas Bacias Hidrográficas. 2. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2011.
- (4) Castro, P.S. Recuperação e conservação de nascentes. Viçosa: CPT, 2007. 272p.
- (5) Pinto, L. V. A.; Botelho, S. A.; Davide, A. C.; Ferreira, E. 2004. Estudo das nascentes da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. Scientia Forestalis, 65: 197-206.
- (6) Valente, O. F.; Gomes, M.A. Conservação de Nascentes: Hidrologia e Manejo de Bacias de Cabeceiras. Viçosa, MG. Editora Aprenda Fácil. 2005. 40 p.
- (7) Pinto, L. V. A.; Botelho, S. A.; Oliveira-Filho, A. T. de; Davide, A. C. 2005. Estudo da vegetação como subsídios para propostas de recuperação das nascentes da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. Revista Árvore, MG, 29 (5): 775-793.

(8) Baggio, A. J.; Carpanezzi, A. A.; Felizari, S. R.; Ruffato, A. Recuperação e proteção de nascentes em propriedades rurais de Machadinho, RS. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 26 p.

(9) PROGRAMA DE FOMENTO AMBIENTAL. Instituto Estadual de Florestas-IEF. Disponível em: [http://www.ief.mg.gov.br/images/stories/notatecnica/nota\\_tecnica\\_fomento\\_ambiental%5B1%5D.pdf](http://www.ief.mg.gov.br/images/stories/notatecnica/nota_tecnica_fomento_ambiental%5B1%5D.pdf). Acesso em: 14 de novembro de 2013.

(10) Botelho, S. A.; Davide, A. C. Métodos silviculturais para recuperação de nascentes e recomposição de matas ciliares. In: Simpósio nacional sobre recuperação de áreas degradadas, 5, 2002, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: 2002. p. 123-145.

(11) IGAM. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Disponível em <<http://www.igam.mg.gov.br/component/content/158?task=view>> acessado em 16 de junho as 20:00.

(12) CEMIG. Companhia Energética de Minas Gerais. Disponível em <[http://www.cemig.com.br/ptbr/A\\_Cemig\\_e\\_o\\_Futuro/sustentabilidade/nossos\\_programas/ambientais/peixe\\_vivo/Paginas/bacias\\_do\\_leste.aspx](http://www.cemig.com.br/ptbr/A_Cemig_e_o_Futuro/sustentabilidade/nossos_programas/ambientais/peixe_vivo/Paginas/bacias_do_leste.aspx)> acessado em 16 de junho as 20:20.

(13) APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for examination of water and wastewater. 22. ed. Denver, 2012.

(14) BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília-DF, 2005.

(15) BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília-DF, seção 1, p. 39, 2011a.

(16) Mota, S. Introdução à engenharia ambiental. 4. ed. Rio de Janeiro: Expressão Gráfica, 2010.

(17) Ferreira, S.A.; Vilela, V.L.D. Análise Microbiológica de Nascentes na Área Rural do Distrito do Pirapó, Apucarana – PR. In: X Fórum multidisciplinar FAP, 2016, Apucarana. Anais... Apucarana: 2016.

(18) Silva, R. C. A; Araújo, T. M. 2010. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). Ciência & Saúde Col. 8 (4):1019 – 1028.

(19) Queiroz, M.F.; Cardoso, M.C.S.; Santana, E.M.; Gomes, A.B.; Rique, S.M.N.; Lopes, C.M. 2002. A qualidade da água de consumo humano e as doenças diarreicas agudas no município de Cabo de Santo Agostinho, PE. Brazilian Journal of Epidemiology, suplemento especial, p.456- 462.

# MARCADORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS PARA MEDICINA PERSONALIZADA DO CÂNCER COLORETAL

## *PREDICTIVE AND PROGNOSTIC BIOMARKERS FOR PERSONALIZED MEDICINE OF COLORECTAL CANCER*

Amanda Vilefort de Melo<sup>1</sup>; Rafaela Marcelle Pacheco Silva<sup>1</sup>; Warne Pedro Andrade<sup>2</sup>, Leticia da Conceição Braga<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Instituto Metodista Izabela Hendrix. Rua da Bahia, 2020 – Lourdes 30160-012 Belo Horizonte – MG. <sup>2</sup>Núcleo Hematologia e Oncologia  
leticia.braga@izabelahendrix.metodista.br.

### RESUMO

O câncer coloretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo sendo responsável, em 2012, por 694.000 mortes em todo o mundo. Apesar dos avanços ocorridos no tratamento do CCR nos últimos anos, a taxa de mortalidade permanece alta, por esse motivo tem se buscado marcadores moleculares que possam auxiliar na individualização do tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes. O presente estudo teve por objetivo realizar meta-análise nas bases de dados PUBMED, COCHRANE LIBRARY e CLINICAL TRIALS, no período entre 2008 a 2018, a fim identificar marcadores preditivos e prognósticos descritos para o CCR. Foi adotada uma estratégia de busca baseada em descritores em inglês, vinculados aos operadores booleanos (AND/OR). Foram incluídos 16 estudos para a realização da meta-análise proposta. A análise, envolvendo 9.114 pacientes com CCR, revelou seis marcadores [deficiência de MMR (dMMR) e expressão das proteínas VEGF-D, TOPO2a+/EGFR-/TP170-, maspin nuclear e Ciclina nuclear D1a e a variante DPYD c.1129-5923 C>G/ hapB3] como preditivos e 10 marcadores [*TP53* mutante, *KRAS* mutante, expressão do miR-326, expressão das proteínas CatS, ERCC-1, SMAD 4 em tumores com MSI, da Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), mutação V600E em *BRAF* combinada com mutação em *KRAS* em tumores com proficiência de MMR (pMMR) e expressão do mRNA de *LGR5* e de *GUCY2C*] como prognósticos. Observou-se que a expressão da proteína VEGF-D (RR: 2.35 [1,80-3,08]) foi o melhor marcador preditivo identificado para CCR e a expressão do mRNA do gene *GUCY2C* (RR: 44.35 [28,75-68,42]) foi o melhor marcador prognóstico. Apesar das melhorias encorajadoras no tratamento e do desfecho clínico dos pacientes com CCR nas últimas duas décadas, apenas o *KRAS* entrou recentemente na prática clínica como um marcador preditivo de resposta à terapia com o anticorpo anti-EGFR. No entanto, o presente estudo ressalta que, a validação clínica de novos marcadores para o CCR é necessária à prática médica e poderá estratificar os pacientes com CCR com grande resolução permitindo otimizar os tratamentos.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, marcadores preditivos, marcadores prognósticos, 5- FU, câncer coloretal.



## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third cancer type in the world. In 2012, it was responsible for 694,000 deaths worldwide. Despite advances in the treatment of CRC, the mortality rate remains high. For this reason, molecular markers approaches could help personalized treatment and increase quality of life and life extension of patients. This study aimed to perform a metaanalysis of the molecular markers in CRC patients. Using english descriptors, linked to Boolean operators (AND / OR), 16 studies, published between 2008 and 2018, were selected from searches of PUBMED, COCHRANE LIBRARY and CLINICAL TRIALS. Our metaanalysis involved 9,114 patients with CRC identified six molecular markers [MMR deficiency (dMMR), TOPO2a+/EGFR-/TP170-, nuclear maspin and Nuclear Cyclin D1a protein expression and DPYD c.1129-5923 C> G / hapB3 variant] as predictive and 10 markers [*TP53* mutant, *KRAS* mutant, expression of miR-326, protein VEGF-D, CatS, ERCC-1, SMAD 4 in MSI and Protein-1 monocyte chemotactic (MCP-1), BRAF V600E/*KRAS* mutant in tumors with MMR proficiency (pMMR), *LGR5* and *GUCY2C* mRNA expression] as prognosis markers. VEGF-D expression (OR: 2.35 [1.80-3.08]) was the best predictive marker while *GUCY2C* gene expression was the best CRC prognosis marker (OR: 44.35 [28.75-68.42]). Despite the improvements in CRC treatment and patient outcome at last two decades, only *KRAS* were introduced clinically as a predictive marker of anti-EGFR therapy. Therefore, clinical validation of new biomarkers is necessary in order to stratify CRC patients at a higher resolution, allowing for optimized treatment.

**Keywords:** Molecular markers, Predictive markers, prognostic markers, 5-FU, Colorectal cancer.

## INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, sendo que 70% das ocorrências dessa neoplasia são esporádicas<sup>(1)</sup>. Segundo dados da World Health Organization (WHO)<sup>(2)</sup>, em 2018, no mundo, o número de mortes por CCR foi de 1,8 milhões de mortes onde os países menos desenvolvidos responderam por 70% dessas mortes. Para o Brasil, foi estimado nos anos de 2018-2019 17.380 casos novos de CCR, com risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. Ainda segundo dados do INCA, em 2015, 8.163 óbitos foram provocados por CCR em homens e 8.533 em mulheres<sup>(3)</sup>.

O CCR é uma neoplasia heterogênea, que surge a partir de mutações em genes específicos chamados oncogenes e genes supressores de tumor e pode ser classificado em carcinomas esporádicos ou de história familiar. Evidências atuais demonstraram que o CCR tem seu processo de tumorigênese iniciado com a mutação no gene polipose adenomatosa coli (APC), um gene supressor de tumor que tem como função normal a regulação negativa da via WNT, através do direcionamento da  $\beta$ -catenina para a degradação proteossômica, sendo assim o principal gene dessa via. Mutações nesse gene causam uma síndrome de câncer hereditário, conhecida como polipose adenomatosa familiar (PAF)<sup>1,3</sup>, bem como tumores esporádicos que não estão relacionados à predisposição genética ou à história familiar da doença.

O processo de tumorigênese se inicia com a via WNT, que tem um papel fundamental na diferenciação de células-tronco e no crescimento celular, favorecendo o aparecimento do tumor. Além disso, as alterações nessa via estão associadas a uma adesão celular reduzida e, portanto, favorece a migração e a metástase<sup>(5)</sup>. Outras vias sinalizadoras da carcinogênese para diferentes tipos de câncer também são descritas no CCR, tais como as vias MAPK e PI3K, envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, o que confere vantagens proliferativas às células tumorais. As principais mutações descritas nessas vias são nos genes Proto-oncogene KRAS (KRAS), Proto-oncogene B-Raf/serina / treonina quinase (BRAF) e fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade alfa catalítica (PI3K)<sup>(6)</sup>. A via TGF- $\beta$ , por sua vez, possui papel imprescindível em processos celulares fundamentais, como diferenciação, crescimento ou apoptose, tendo como um dos principais genes o Membro 4 da família SMAD (SMAD4)<sup>(7)</sup>. Todas essas vias conferem vantagem na tumorigênese e determinam a progressão da doença e a resposta ao tratamento<sup>(4)</sup>.

Nos últimos anos, ocorreram grandes avanços no tratamento do CCR. Entretanto, a mortalidade dessa doença permanece alta, com 40 a 50% dos pacientes evoluindo ao óbito<sup>(6)</sup>. O estágio da doença, permanece como principal fator prognóstico. Para pacientes com CCR diagnosticado em estágio localizado, a

sobrevida livre da doença (SLD) em cinco anos de 90%, enquanto para diagnósticos em estágios mais avançados, a SLD em cinco anos é de menos de 10%<sup>(8)</sup>. Além disso, o CCR geralmente está associado a uma perda da qualidade de vida dos pacientes afetados, o que poderá estar relacionada às consequências diretas da doença e/ou do tratamento<sup>(6)</sup>.

Devido a esses fatores, a busca de marcadores moleculares que possam auxiliar na individualização do tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes é extremamente relevante. Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares, os marcadores preditivos e prognósticos, são os principais marcadores utilizados para esse propósito. Marcadores preditivos são utilizados para definir a correspondência de terapias direcionadas que sejam mais eficazes e para prevenção da toxicidade de terapias sistêmicas, enquanto que, os marcadores prognósticos identificam mutações somáticas que podem levar a uma piora nas taxas de sobrevida dos pacientes e aumentar o risco de metástases e quimioresistência<sup>(9)</sup>. O presente estudo tem como objetivo realizar o levantamento dos principais marcadores moleculares preditivos e/ou prognósticos descritos na literatura para CCR e também realizar uma meta-análise para elucidar qual o melhor marcador preditivo e prognóstico para o CCR.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ESTRATÉGIA DE BUSCA**

Este estudo trata-se de uma revisão sistemática seguida de meta-análise, elaborada com bases em artigos científicos sobre marcadores moleculares para o CCR, retirados da base de dados do PUBMED, COCHRANE LIBRARY, no período entre 2008 a 2018. Como estratégia de busca foi adotada a procura, por artigos em inglês, usando os descritores mencionados abaixo, com o auxílio de aspas para identificação de palavras compostas e vinculados aos operadores booleanos (AND/OR). As aplicações na busca ocorreram da seguinte forma: (i) “molecular markers” or “predictive markers” and “colorectal cancer”; (ii)

“molecular markers” or “prognosis markers” and “colorectal cancer”; (iii) “molecular markers” and “colon cancer”; (iv) “molecular markers” and “prognosis markers” or “predictive markers” and “colorectal cancer”; (v) “prognosis markers” or “predictive markers” and “colon cancer” ; (vi) “molecular markers” and “colorectal cancer” or “colon cancer”.

A busca também incluiu estudos clínicos disponíveis na base de dados do clinical trials, no mesmo período, que abordassem sobre marcadores moleculares preditivos e prognósticos para o CCR. A estratégia de busca para os estudos clínicos foi a mesma adotada para a busca de artigos, porém um número menor de descritores foi utilizado, porque o buscador da base possui um limitador de palavras. As aplicações ocorreram da seguinte forma: (i) “Molecular markers” or 5-FU and “colorectal cancer”; (ii) 5-FU and “colorectal cancer”; (iii) “colorectal cancer” and “molecular markers”.

Para fins de agrupamento dos artigos e estudos clínicos que compõem este trabalho, após a exportação nas bases de dados, foi feita uma análise manual dos mesmos, que serviu como base para a eliminação de estudos clínicos e artigos que se encaixavam nos critérios de exclusão e artigos duplicados.

#### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão desse estudo foram: artigos completos publicados nos últimos 10 anos em inglês, apresentando estudos clínicos transversais ou caso controle em fase de recrutamento ou concluídos associados a pacientes com CCR, em qualquer estágio da doença, tratado com 5- Fluorouracil (5-FU).

Os critérios de exclusão foram: artigos do tipo revisões narrativa, sistemática ou meta-análise), diretrizes clínicas, artigos em outros idiomas, sem associação com CCR, que não abordassem marcadores moleculares preditivos e/ou prognósticos e publicações anteriores à 2008.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a seleção dos estudos e identificação das possíveis variáveis, os resultados foram inseridos no programa REVMAN 5 (versão 5.3.5) disponível em <http://www.community.cochrane.org/>. Foram utilizados os seguintes parâmetros

para identificação dos marcadores preditivos: presença de mutação e/ou no nível de expressão da proteína e/ou mRNA do gene alvo, que resultaram em benefício da terapia. Para os marcadores prognósticos foram considerados a presença de mutação e/ou no nível de expressão da proteína ou mRNA do gene alvo que resultaram em melhores taxas de sobrevida global (SG), SLD e tempo de recorrência do tumor (ITT). Foi aplicada análise estatística randômica de proporção univariada, com intervalo de confiança de 95% (IC95%) para estimar os marcadores moleculares (preditivos e prognósticos) mais eficientes identificados.

## RESULTADOS

A busca inicial por artigos e estudos clínicos nas bases de dados, utilizando os descritores apresentados na metodologia, identificaram 512 artigos e 115 estudos clínicos. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão na forma de filtros, foram excluídos 489 artigos e 107 estudos clínicos em virtude de duplicidade, falta de enquadramento ao tema proposto pelo trabalho e pelo tipo de estudo realizado. 23 artigos e oito estudos clínicos foram selecionados para uma análise manual e leitura integral. Após esta análise, outros 10 artigos e cinco estudos clínicos foram excluídos por não se tratarem de estudos transversais e caso controle ou não se enquadrarem no tema proposto. Assim, foram selecionados 13 artigos e três estudos clínicos como elegíveis para a revisão sistemática e meta-análise (Figura 1, Tabela 1).

Os 13 artigos e três estudos clínicos elegíveis foram publicados nos últimos 10 anos sendo realizados em diversos países dos seguintes continentes: América, Europa e Ásia. Em três artigos não foi possível determinar em qual localidade os estudos foram conduzidos. Ao todo 16 marcadores, 10 marcadores prognósticos e seis marcadores preditivos para o CCR, foram identificados. Nas análises dos marcadores moleculares identificados foram avaliadas mutações somáticas, alterações no perfil de metilação do DNA e nos níveis de expressão de mRNA,

microRNAs (miRNAs) e proteínas associadas ao CCR. O método mais utilizado para a descoberta dos marcadores foi imunohistoquímica (Tab. 1).

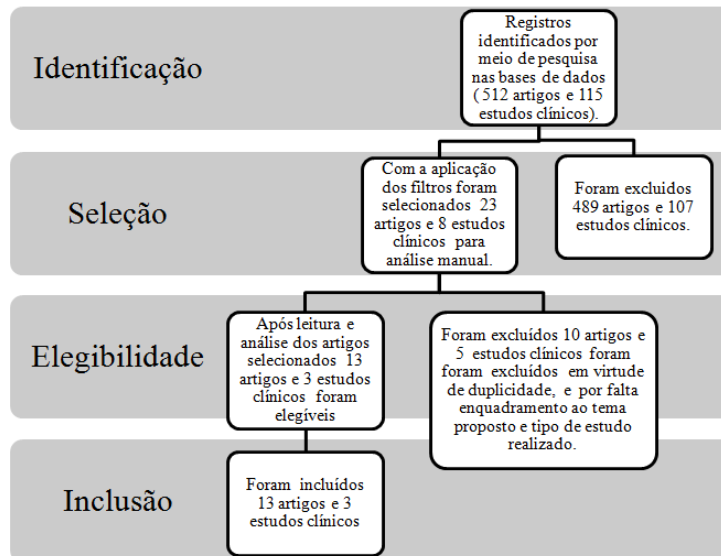


Figura 1: Fluxograma de artigos e estudos clínicos elegíveis.

A casuística avaliada na meta-análise foi composta de 9.114 pacientes com CCR, sendo que o número de mulheres 4.100 (45%) e o número de homens 5.014 (55%). A média de idade dos pacientes foi maior que 50 anos em 87% dos estudos. Dessa população, cerca de 4.010 pacientes se encontravam em estágios iniciais da doença (I/II) e 5.104 pacientes estavam com o câncer em estágio avançado (III/IV).

Os resultados da meta-análise mostraram que a média de RR entre os estudos que foi 0,91 (0,45-1,86). O melhor marcador preditivo encontrado para o CCR foi a expressão da proteína VEGF-D, proposto no estudo clínico de Tabernero et al (2015) <sup>(15)</sup> (RR: 2,35; IC95% 1,80-3,08) (Tab. 2). Sendo que 3/6 estudos considerado o RR foi maior que 1, o que significa que nesses estudos os marcadores levaram a um maior efeito benefício da quimioterapia nos pacientes que apresentaram o marcador do estudo (Fig. 2).

Tabela 1- Características gerais dos estudos avaliados na revisão sistemática e meta-análise.

<b>Autores</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Marcador estudado</b>	<b>M</b>	<b>Método utilizado</b>	<b>RR</b>
Alex et al <sup>(10)</sup>	762	MMR deficiente	PE	1 e 7	0.33
Han et al <sup>(11)</sup>	953	Expressão de TOPO2a, EGFR e TP170	PE	7 e 10	1.02
Hestetun et al <sup>(12)</sup>	425	Expressão de Nuclear maspin	PE	7	0.30
Lee et al <sup>(13)</sup>	1953	Expressão de DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3	PE	8	1.47
Myklebust et al <sup>(14)</sup>	412	Ciclina D1a e D1b	PE	7	1.21
Taberner et al <sup>(15)</sup>	1072	Expressão de VEGF-D	PE	6 e 7	2.35
Gormley et al <sup>(16)</sup>	560	Expressão de CatS	PO	7	4.50
Kandioler et al <sup>(17)</sup>	572	Mutação do TP53	PO	1	3.14
Kjersem et al <sup>(18)</sup>	24	Expressão do miR-326	PO	10	0.31
Mejia et al <sup>(19)</sup>	360	Expressão do mRNA GUCY2C	PO	3	44.35
Parekh et al <sup>(20)</sup>	376	Expressão de ERCC-1	PO	2	1.07
Roth et al <sup>(21)</sup>	3278	Expressão de SMAD 4 em relação tumores com MSI	PO	1, 2 e 7	0.01
Sinicrope et al <sup>(22)</sup>	2720	Mutação do BRAF, KRAS e MMR	PO	1, 3 e 5	0.72
Smith et al <sup>(23)</sup>	1076	Mutação do KRAS	PO	4	1.01
Stanisavljevic et al <sup>(24)</sup>	412	Expressão do mRNA LGR5	PO	9	1.18
Watanabe et al <sup>(25)</sup>	101	Expressão de Proteína-1 quimiotática de monócitos	PO	7	0.51

Tipo de marcador (M): Preditivo (PE) e Prognóstico (PO); Método utilizado: (1) sequenciamento de DNA, (2) PCR quantitativa em tempo real, (3) RT-PCR, (4) PCR-ARMS, (5) PCR metilação específica, (6) imunoblotting, (7) imunohistoquímica, (8) espectrometria de massa (MALDI-TOF), (9) hibridização in situ, (10) análise da expressão de mRNA; RR: Risco Relativo.

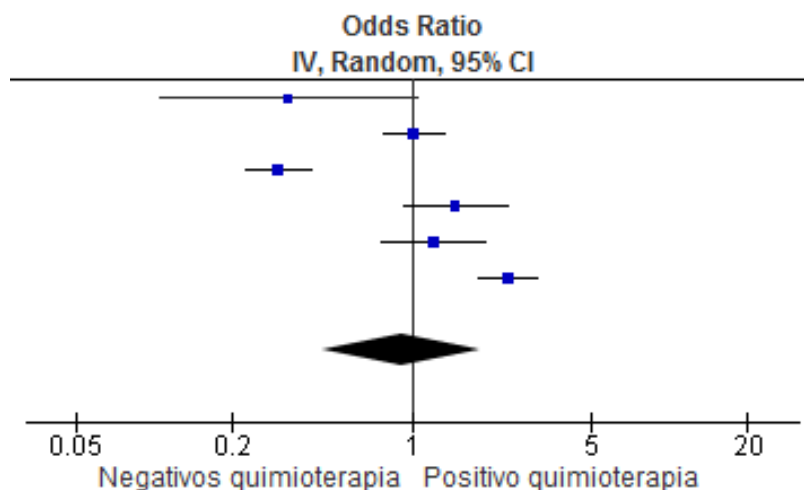


Figura 2 - “Forest Plot” relacionando os marcadores preditivos e o seu benefício para a quimioterapia.

A Tabela 3 apresenta a análise a partir dos estudos com marcadores prognósticos. A média de RR obtida foi 1,02 (0,31-3,37). O melhor marcador prognóstico identificado para o CCR foi a expressão do mRNA do gene *GUCY2C* descrito por Meija et al<sup>(19)</sup> (RR: 44,35 IC95% 28,75-68,42). Observa ainda que, na maioria dos estudos considerados (6/10), RR foi próximo ou maior que 1, o que significa que esses marcadores foram capazes de identificar grupos de pacientes com maiores taxas de sobrevida (Figura 3).

Tabela 2 – Risco Relativo obtido para os marcadores preditivos evidenciados em cada estudo.

Estudo ou subgrupo	Marcação positiva		Marcação Negativa		Peso	RR (95% CI)
	Eventos	Total	Eventos	Total		
Alex et al 2016 <sup>(10)</sup>	4	34	24	84	12.4%	0.33 [0.11, 1.05]
Han et al 2016 <sup>(11)</sup>	150	453	148	453	17.9%	1.02 [0.77, 1.35]
Hestetun et al 2015 <sup>(12)</sup>	135	380	245	380	17.8%	0.30 [0.23, 0.41]
Lee et al 2016 <sup>(13)</sup>	46	638	32	638	17.0%	1.47 [0.92, 2.34]
Myklebust et al 2012 <sup>(14)</sup>	76	145	69	145	17.0%	1.21 [0.77, 1.92]
Tabernero et al 2015 <sup>(15)</sup>	270	446	176	446	17.9%	2.35 [1.80, 3.08]
Total (95% CI)		2096		2146	100.0%	0.91 [0.45, 1.86]
Total de Eventos	681		694			
Heterogeneidade: Tau <sup>2</sup> = 0.72; Chi <sup>2</sup> = 107.71, df= 5 (P < 0.00001); I <sup>2</sup> = 95%						
Teste para efeito global: Z= 0.26 (P= 0.80)						

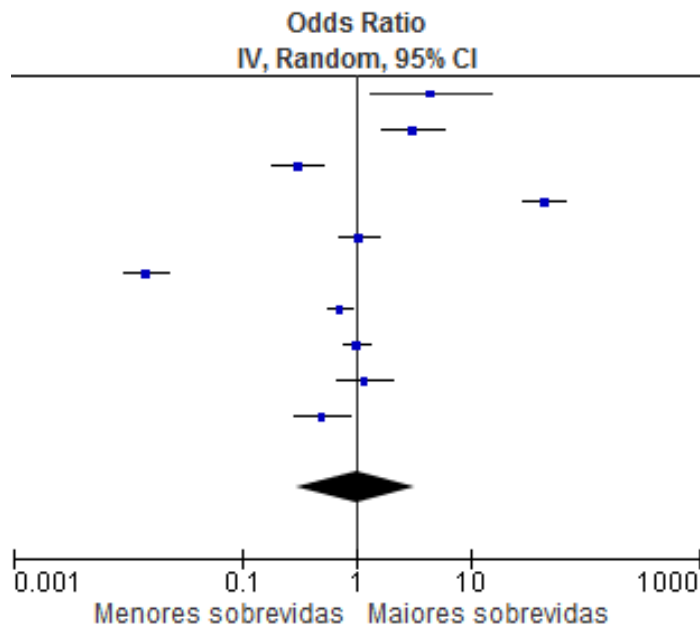


Figura 3 - “Forest Plot” relacionando os marcadores prognósticos com as maiores taxas de sobrevida.

Tabela 3 – Odds Ratio obtido para os marcadores prognósticos evidenciados em cada estudo.

Estudo ou subgrupo	Marcação positiva		Marcação Negativa		Peso	RR (95% CI)
	Eventos	Total	Eventos	Total		
Gormley et al 2011 <sup>(16)</sup>	11	17	11	38	9.3	4.50 [1.33, 15.20]
Kandioler et al 2015 <sup>(17)</sup>	119	143	49	80	10.0%	3.14 [1.67, 5.88]
Kjersem et al 2014 <sup>(18)</sup>	44	123	79	123	10.0%	0.31 [0.18, 0.52]
Mejia et al 2009 <sup>(19)</sup>	313	360	47	360	10.1%	44.35 [28.75, 68.42]
Parekh et al 2016 <sup>(20)</sup>	67	188	64	188	10.1%	1.07 [0.70, 1.64]
Roth et al 2012 <sup>(21)</sup>	44	408	364	408	10.1%	0.01 [0.01, 0.02]
Sinicrope et al 2015 <sup>(22)</sup>	138	437	265	680	10.2%	0.72 [0.56, 0.93]
Smith et al 2010 <sup>(23)</sup>	204	358	285	502	10.2%	1.01 [0.77, 1.33]
Stanisavljevic et al 2016 <sup>(24)</sup>	40	66	108	191	10.0%	1.18 [0.67, 2.09]
Watanabe et al 2008 <sup>(25)</sup>	42	101	59	101	10.0%	0.51 [0.29, 0.89]
Total (95% CI)		2201		2671	100.0%	1.02 [0.37, 3.37]
Total de eventos	1022		1331			
Heterogeneidade: Tau <sup>2</sup> = 3.65; Chi <sup>2</sup> = 690.43, df= 9 (P < 0.00001); I <sup>2</sup> = 99%						
Teste para efeito global: Z= 0.03 (P= 0.98)						

## DISCUSSÃO

Vários alvos moleculares veem sendo estudados como marcadores preditivos e prognósticos para o CCR<sup>(9)</sup>. O presente estudo revelou por meio de uma meta-análise, envolvendo 9.114 pacientes com CCR, seis marcadores como preditivos e 10 prognósticos. Os marcadores preditivos foram: dMMR e expressão das proteínas Ciclina Nuclear D1a, Maspin Nuclear, TOPO2a+/EGFR-/TP170-, VEGF-D e a variante DPYD c.1129-5923 C>G/ hapB3 (Tab. 1). Observou-se que a expressão da proteína VEGF-D (RR: 2,35; IC95% 1,80-3,08) foi o melhor marcador preditivo.

O reparo de reparo de mal pareamento do DNA ou “mismatch repair” (MMR) é responsável pela manutenção da estabilidade do genoma. De modo que, mutações em genes desta via causam deficiência do MMR (dMMR), o que resulta em um fenômeno conhecido como instabilidade de microssatélite (MSI)<sup>(10)</sup>. A MSI é um importante biomarcador no CCR, com implicações cruciais no diagnóstico, prognóstico e, mais recentemente, na predição terapêutica. O teste de dMMR/MSI é recomendado durante a triagem para a síndrome de Lynch, uma doença hereditária autossômica dominante que é caracterizada por mutações germinativas nos genes MMR e associada a um risco aumentado de vários tipos de câncer, incluindo CCR<sup>(26)</sup>. Além disso, o estado MSI-high (MSI-H) tem sido associado a um melhor prognóstico dos pacientes com CCR<sup>(27)</sup>.

Além disso, usando dados de ensaios clínicos randomizados que incluíram pacientes com dMMR CCR e uso de terapia baseada em 5-FU comparados com o grupo controle, composto de pacientes com dMMR CCR que somente receberam tratamento cirúrgico, permitiu definir que o *status* de MMR pode fornecer uma metodologia sensível para estratificação de pacientes com CCR para terapia adjuvante baseada em 5-FU, uma vez que a SLD apresentados pelo primeiro grupo foi significativamente mais promissores que no grupo controle<sup>(28)</sup>. Além disso, Alex et al<sup>(10)</sup> demonstraram que o *status* dMMR em pacientes com CCR metastático

determinava a resistência (menor resposta ao tratamento) à quimioterapia baseada em oxaliplatina enquanto que pacientes pMMR eram mais sensíveis.

A Ciclina Dependente de Quinase (CDK) é um complexo heterodimérico composto de uma subunidade catalítica, a CDK e uma subunidade reguladora chamada ciclina que são responsáveis pelas transições do ciclo celular. Das várias famílias de CDKs e ciclinas, a superexpressão de ciclina D1 é mais frequentemente associada a malignidade humana e possui um papel como um sensor mitogênico para a máquina do ciclo celular<sup>(29)</sup>.

Outro estudo identificou a interação entre ciclina nuclear D1 e proteínas de reparo do DNA. Os autores demonstraram que o recrutamento da ciclina D1a, mas não da ciclina D1b, para a cromatina é suficiente para que a resposta ao dano no DNA (DDR) seja iniciada, o que indicou que o silenciamento endógeno de ciclina D1, em células de CCR tratadas com 5-FU, reduz a DDR em resposta ao tratamento<sup>(30)</sup>. Devido a esse papel, Myklebust et al<sup>(14)</sup> estudaram o papel da ciclina D1 como marcador molecular do CCR, eles descobriram que alta expressão da ciclina D1 prediz resposta favorável para terapia adjuvante com 5-FU em pacientes com CCR.

Hestetun et al<sup>(12)</sup> demonstraram que a baixa expressão de Maspín Nuclear em pacientes com CCR primário foi capaz de prever o benefício da quimioterapia adjuvante 5-FU combinada com levamisol (5-FU /Lev). Maspín Nuclear é um membro da superfamília inibidora da serina-protease (SERPIN) e exerce atividades de supressor tumoral, inibindo a formação de tumores, migração de células cancerosas, invasão, metástase e angiogênese em CCR. Contudo, seu papel parece contraditório. Outros estudos descrevem que Maspín Nuclear pode exercer funções diferentes dependendo do tipo de tumor e associando esse marcador à fatores prognósticos adversos<sup>31,32</sup>.

Topoisomerasas são enzimas encarregadas por exercer sua função durante vários processos de metabolismo do DNA, incluindo controle da transcrição, replicação, recombinação e segregação de cromossomos durante a divisão celular<sup>(33)</sup>, sua expressão é dependente do ciclo celular com pico expressão na fase

G2/M do ciclo celular e declínio para o mínimo no final da mitose<sup>(34)</sup>. De modo que, essa enzima pode ser considerada como marcador preditivo, porque sua amplificação no gene *TOPO2a* leva à superexpressão da proteína *TOPO2a* e, por fim, a uma melhor resposta aos quimioterápicos, enquanto que a deleções em *TOPO2a* resultam em redução da expressão da proteína *TOPO2a* e, assim, induz quimiorresistência primária aos medicamentos anticancerígenos inibidores *TOPO2a*<sup>(35)</sup>. Por outro lado, o receptor EGFR, um receptor tirosina quinase, é responsável pela transdução de sinal que modula a proliferação, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação celular<sup>(36)</sup>.

Assim, durante a carcinogênese, os ligantes desse receptor atuam como potentes fatores pró-angiogênicos<sup>(37)</sup>. A proteína TP170, é a maior subunidade putativa de IF3 e pode regular positivamente a ribonucleótido redutase M2, promovendo crescimento e proliferação celular. Elevados níveis de TP170 tem sido descrito em cânceres da mama, do colo do útero, do esôfago e do pulmão, sugerindo que essa proteína pode ter um importante papel na transformação maligna e no controle do crescimento celular<sup>(38)</sup>. Han et al<sup>(11)</sup> demonstraram que a associação da expressão a superexpressão de *TOPO2a*, subexpressão de EGFR e de TP170 (*TOPO2a+/EGFR-/TP170-*) pode ser um potencial marcador preditivo de resposta quimioterápica a combinação entre 5FU, ácido folínico e oxaliplatina (FOLFOX). Eles avaliaram os desfechos clínicos de 902 pacientes com CCR de alto risco no estágio III com e sem o uso de FOLFOX e observaram aumento da sobrevida no grupo com uso de FOLFOX.

A variante DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 tem tradicionalmente sido associado à estudos farmacogenéticos relacionados a 5-FU. O gene DPYD codificada a enzima desidrogenase diidropirimidina (DPD), que atua no catabolismo de 5-FU. DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 codifica uma enzima com atividade limitada. Segundo o estudo de Lee et al<sup>(13)</sup>, DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 tem valor preditivo para toxicidade grave à quimioterapia baseada em 5-FU em pacientes com CCR. Os autores descrevem ainda outras três variantes do gene DPYD, DPYD\*2A (c.1905 + 1 G> A; rs3918290), D949V (c.2846 A>T;

rs67376798) e I560S (c.1679 T> G, DPYD\*13, rs55886062) como funcionalmente deletérias, afetando a atividade de DPYD e correlacionando com a toxicidade grave de 5-FU<sup>(13)</sup>.

A expressão de VEGF-D (fator de crescimento endotelial vascular D) foi identificado como melhor marcador preditivo encontrado nessa revisão, onde pacientes que possuem elevados níveis da expressão da proteína VEGF-D tem 2.35 chances maior de responder a terapia-alvo com ramucirumab que pacientes que não possuem. As terapias-alvo são produtos da medicina de precisão que visam um tratamento individualizado. Alguns alvos, no entanto, podem estar presentes em menos de 5 a 10% da população de pacientes, o que determina que pacientes precisam ser triados para tornar-se elegível para o tratamento<sup>(9)</sup>.

Este marcador foi descrito por Taberero et al<sup>(15)</sup> que observaram que níveis mais elevados de expressão de VEGF-D é um marcador preditivo eficaz para elegibilidade de pacientes para uso do ramucirumab. O ramucirumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humano que se liga especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) com alta afinidade, impedindo a ligação dos ligantes agonistas VEGF-A, VEGF- C e VEGF-D e, conseqüentemente, a ativação do VEGFR-2. O uso de ramucirumab tem mostrado resultados melhores no tratamento em comparação com outras terapias com anticorpos monoclonais por impedir a ligação de qualquer um dos ligantes e não apenas do VEGF-A<sup>(39)</sup>.

Outros fatores corroboram com a identificação da expressão de VEGF-D como melhor marcador preditivo. Níveis aumentados de expressão do mRNA ou da proteína de *VEGF-D* foram observados em CCR em alguns estudos, mostrando uma associação entre o aumento de VEGF-D e variáveis clinico-patológicas adversas, incluindo metástase de linfonodos e redução da sobrevida do paciente<sup>(40)</sup>. Além disso, alguns estudos mostram que a expressão de mRNA de VEGF-D é significativamente menor nos tecidos de CCR quando comparados à mucosa normal, sem correlação com metástases linfáticas<sup>(41)</sup>.

Dez marcadores prognósticos identificados neste estudo foram: *TP53* mutante, *KRAS* mutante, expressão do miR-326, expressão das proteínas CatS, ERCC-1, SMAD 4 em tumores com MSI, da Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), mutação V600E em *BRAF* combinada com mutação em *KRAS* em tumores com pMMR e expressão do mRNA de *LGR5* e de *GUCY2C* (Tab. 1). Observou-se que a expressão do mRNA do gene *GUCY2C* foi o melhor marcador prognóstico para CCR (RR: 44,35; IC95% 28,75-68,42), o que significa que pacientes que super expressavam *GUCY2C* tem uma chance 44,35 vezes maior de sobrevida que os pacientes que não expressavam ou possuíam baixa expressão do mRNA de *GUCY2C*.

*GUCY2C* (Guanilil Ciclase C) é um receptor para os hormônios guanilina e uroguanilina, pertencente a uma família de proteínas sintetizando GMP cíclico (cGMP), cuja interação com o domínio extracelular ativa o domínio catalítico citoplasmático, induzindo o acúmulo de cGMP. *GUCY2C* regula a homeostase, coordenando a proliferação, o reparo do DNA, a programação metabólica e a transição epitélio-mesenquimal, sustentando a hipótese na qual seu silenciamento contribui para a tumorigênese<sup>(42)</sup>. No estudo de Meija et al<sup>(19)</sup> descrevem que a detecção prospectiva de metástases ocultas por meio da avaliação da expressão do mRNA de *GUCY2C*, por qRT-PCR, destacando este alvo como um importante marcador prognóstico independente de risco.

Dentre os marcadores prognóstico identificados neste estudo está o gene *TP53*. A proteína codificada por esse gene, através de sua ligação com o DNA, ativa a transcrição de outros genes que controlam as principais funções celulares envolvidas na manutenção da estabilidade genômica; como indução de apoptose, reparo de DNA e regulação do ciclo celular<sup>(43)</sup>. Em virtude disso, tem se atribuído um grande potencial à *TP53* como biomarcador em vários tipos de tumores.

Mutações somáticas no gene *TP53* são as alterações genéticas mais comuns encontradas no cânceres humanos, ocorrendo em cerca de metade de todos os tumores, incluindo o CCR. No estudo de Kandolier et al<sup>(17)</sup> avaliando se e como o estado de mutação da *TP53* está ligado à eficácia variável do tratamento com 5FU

em CCR estágio III descobriram que o estado TP53 (selvagem ou mutante) é capaz de prever o efeito adjuvante 5FU na sobrevida em pacientes N1 (com uma a três metástases em linfonodos regionais), identificando assim seu valor prognóstico.

O microRNA miR-326 foi que outro marcador prognóstico identificado, cujo alvo é o mRNA da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP-1)<sup>(44)</sup>. MRP-1 é um transportador cassete de ligação de adenosina trifosfato (ABC) que diminui o acúmulo intracelular de drogas devido ao seu efluxo ativo. O aumento da expressão desse transportador está associado à resistência a múltiplas drogas. Interessantemente, níveis elevados de expressão miR-326 estão associados a baixa SG e SLD em pacientes com CCR metastático tratados com 5-FU/oxaliplatina<sup>(18)</sup>. Este achado ressalta a complexidade do entendimento da interação entre o miRNA e seu alvo. Segundo Kjersem et al<sup>(18)</sup>, mecanismos subjacentes podem explicar os diferentes resultados clínicos em pacientes com CCR com níveis elevados de miR-326 apresentarem bom prognóstico.

Juntamente com *TP53*, os genes *KRAS* e *BRAF* também são os genes mais comumente mutados no CCR. Diferentes mutações nesses genes estão associadas a um prognóstico ruim, especialmente naqueles tumores com MSI<sup>(45)</sup>. Mutações em *KRAS* no códon 13 do éxon 2 estão associadas com menores taxas de sobrevida, enquanto que mutações no códon 12 do éxon 2 estão associadas a risco de metástases<sup>(4)</sup> e apresentam valor prognóstico negativo em pacientes com CCR metastático que recebem tratamento com FOLFOX/XELOX<sup>(23)</sup>. Em *BRAF*, a mutação V600E é a mais comum em diferentes tipos de cânceres e embora constitua um fator prognóstico ruim em tumores metastático, é um alvo promissor para uso de terapia-alvo, através da combinação de inibidores *BRAF* V600E específicos com outros inibidores da via MAPK/PI3K<sup>(46)</sup>. Por outro lado, a taxa de SLD em 5 anos para pacientes com CCR, pMMR e que apresentavam mutações *BRAF* (V600E) e *KRAS* foram significativamente menores que a SLD em pacientes com CCR, pMMR e com *BRAF* e *KRAS* selvagem<sup>(22)</sup>.

A catepsina S (CatS) foi um oncogene identificado como marcador prognóstico em vários estudos e sua regulação positiva ligada à agressividade da

doença em vários tipos de tumor. CatS promove a invasão e a neo-angiogênese por meio da degradação da matriz extracelular e da liberação de fatores de crescimento derivados da matriz que impulsionam a troca angiogênica<sup>(16)</sup>. Em glioblastoma, CatS tem valor prognóstico negativo independente do risco<sup>(47,48)</sup>. Segundo Gormley et al<sup>(16)</sup>, pacientes com CCR, tratados apenas com cirurgia e que apresentam um aumento da expressão de CatS apresentam redução da SLD, demonstrando o valor prognóstico deste alvo também para CCR.

Finalmente, *SMAD4* e *ERCCI* foram dois importantes supressores tumorais identificados neste estudo como marcador prognóstico. *SMAD4* (membro 4 da família *SMAD*) é fosforilada e ativada por receptores transmembrana serina-treonina quinases em resposta ao fator de crescimento TGF-beta e forma complexos homoméricos e heteroméricos com outras proteínas *SMAD* ativadas, que então se acumulam no núcleo e regulam a transcrição de genes alvo. A perda ou deficiência de *SMAD* leva evasão da apoptose e a desregulação do ciclo celular<sup>(4)</sup>. Roth et al<sup>(21)</sup> descreveram que pacientes com CCR do subgrupo T3N1, com MSI-H, mas que não apresentavam perda de expressão de *SMAD4* apresentavam bom prognóstico.

*ERCCI* tem um papel crítico na via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER). A proteína codificada por esse gene forma um heterodímero com a endonuclease XPF (também conhecida como *ERCC4*) e catalisa a incisão 5' no processo de excisão da lesão de DNA provocada por carcinógenos ambientais e ocupacionais que formam adutos de DNA<sup>(49)</sup>. Pacientes tratados com oxaliplatina, que exibiam baixos níveis de mRNA *ERCCI* mostraram significativas diferenças na SG e SLD quando comparados com pacientes que exibiam altos níveis de expressão desse gene. Além disso, a expressão de *ERCCI* pode auxiliar na estratificação de pacientes com CCR estágio III/IV que se beneficiam com a quimioterapia a base de oxaliplatina<sup>(50)</sup>.

## CONCLUSÃO

Apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico do CCR, esses não incorporaram de modo significativo melhoria das taxas de SG e SLD dos pacientes. Com isso, a busca por marcadores moleculares que impactariam de forma positiva essas taxas ainda é uma demanda eminente nos estudos clínicos. Nosso estudo mostra como diferentes marcadores preditivos e prognósticos podem refinar informações clínicas dos pacientes com CCR, prevendo o benefício máximo no tratamento para uma coorte de pacientes. Contudo, embora hajam resultados encorajadores obtidos com a triagem usando marcadores moleculares, ainda hoje, apenas *KRAS* entrou recentemente na prática médica como um marcador preditivo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- (1) Testa, U.; Castelli, G.; Pelosi, E. 2018. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers*, 10 (8): 248.
- (2) World Health Organization. 2018. Cancer. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.
- (3) BRASIL. 2018. Estimativas 2018: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>
- (4) Mármol, I.; Sánchez-De-Diego, C.; Dieste, A.; Cerrada, E.; Yoldi, M. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci*, 18 (1): 197.

- (5) Sebio, A.; Kahn, M.; Lenz, H-J. 2014. The potential of targeting Wnt/b-catenin in colon cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 18 (6), 611-615.
- (6) Kuipers, E. J.; Grady, W. M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T, Sung J. J.; Boelens, P. G.; Van De Velde C.J.; Watanabe T. 2015. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1:15065. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65.
- (7) Abraha, A. M; Ketema, E. B. 2016. Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 8 (8): 583- 591.
- (8) Brenner, H.; Chen, C. 2018. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *British Journal of Cancer*; 119, (7): 785-792. DOI: 10.1038/s41416-018-0264-x.
- (9) Kalia, M. 2015. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism clinical and experimental*, 64 (3 Suppl 1): 16- 21. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.027.
- (10) Alex A. K.; Siqueira S.; Coudry R.; Santos J.; Alves M.; Hoff P. M.; Riechelmann R. P. 2016. Response to chemotherapy and prognosis in metastatic colorectal cancer with DNA deficient mismatch repair. *Clinical Colorectal Cancer*, 16 (3): 228-239. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.11.001.
- (11) Han, Y.; Lu, S.; Yu, F.; Liu, X.; Sun, H.; Wang, J.; Zhu, X.; Lu, H.; Yue, H.; Wang, J.; Lin, J.; Zhou, C.; Tang, H.; Peng, Z. 2016. A comparative analysis and guidance for individualized chemotherapy of stage II and III colorectal cancer patients based on pathological markers. *Scientific Reports*, 6: 37240. DOI: 10.1038 / srep37240
- (12) Hestetun K. E., Brydøy H., Myklebust M. P., Dahl S. 2015. Nuclear maspin expression as a predictive marker for fluorouracil treatment response in colon cancer. *Acta Oncologica*, 54 (4): 470–479.
- (13) Lee, A. M.; Alberts, S. R.; Sargent, D. J.; Sinicrope, F. A.; Berenberg, J. L.; Grothey, A. F.; Polite, B. N.; Chan, E. T.; Gill, S. F.; Kahlenberg, M. S.; Nair, S. G.; Shields, A. F.; Goldberg, R. M.; Diasio, R. B. 2016. Association between DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 and severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in stage III colon cancer patients: NCCTG N0147 (Alliance). *Pharmacogenet Genomics*, 26 (3): 133–137.
- (14) Myklebust, M. P.; LI, Z.; Tran, T. H.; Rui, H.; Knudsen, E. S.; Elsaleh H.; Fluge, O.; Vonen, B.; Myrvold, H. E.; Leh, S.; Tveit, K. M.; Pestell, R. G.; Dahl, O. 2012. Expression of cyclin D1a and D1b as predictive factors for treatment response in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 107 (10): 1684-1691.

(15) Tabernero, J.; Yoshino, T.; Cohn, A. L.; Obermannova, R.; Bodoky, G.; Garcia-Carbonero, R.; Ciuleanu, T. E.; Portnoy, D. C.; Van Cutsem, E.; Grothey, A.; Prausová, J.; Garcia-Alfonso, P.; Yamazaki, K.; Clingan, P. R.; Lonardi, S.; Kim, T. W.; Simms, L.; Chang, S. C.; Nasroulah, F. 2015. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. Lancet Oncol. 16 (5):499-508. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70127-0.

(16) Gormley, J. A.; Hegarty, S. M.; O'grady, A.; Stevenson, M. R.; Burden, R. E. Barrett, H. L.; Scott, C. J.; Johnston, J. A.; Wilson, R. H.; Kay, E. W.; Johnston, P. G.; O'llwill, S. A. 2011. The role of Cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study. British Journal of Cancer, 105 (10): 1487 – 1494.

(17) Kandolier, D.; Mittlböck, M.; Kappel, S.; Puhalla, H.; Herbst, F.; LANGNER, C.; Wolf, B.; Tschmelitsch, J.; Schiperser, W.; Steger, G.; Hofbauer, F.; Samonigg, H.; Gnant, M.; Teleky, B.; Kührer, I. 2015. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5- Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. EBioMedicine, 2 (8): 825–830. DOI: 10.1016 / j.ebiom.2015.06.003

(18) Kjersem, J.B; Ikdahl, T.; Lingjaerde, O. C.; Guren, T.; Tveit, K. M.; Kure E. H. 2014. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin based treatment. Molecular Oncology, 8 (1): 59-67. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.09.001.

(19) Mejia, A.; Schulz, S.; Hyslop, T.; Weinberg, D. S.; Waldman, S. A. 2009. GUCY2C reverse transcriptase PCR to stage pN0 colorectal cancer patients. Expert Rev Mol Diagn, 9, (8): 777–785. DOI: 10.1586 / er.09.67

(20) Parekh, S.; Ziegenhain, C.; Vieth, B.; Enard, W.; Hellmann, I. 2016. The impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq. Scientific Reports, 6: 25533. DOI: 10.1038/srep25533.

(21) Roth, A. D.; Delorenzi, H.; Tejpar, S.; Yan, P.; Klingbiel, D.; Fiocca, R.; D'ario, L.; Cisar, G.; Labianca, R.; Cunningham, D.; Nordlinger, B.; BOSMAN, F.; Van Cutsem, E. 2012. Integrated Analysis of Molecular and Clinical Prognostic Factors in Stage II/III Colon Cancer. J Natl Cancer Inst, 104 (21): 1635–1646. DOI: 10.1093 / jnci / djs427

(22) Sinicrope, F. A; Shi, Q.; Smyrk, T. C.; Thibodeau, S. N.; Dienstmann, R.; Guinney, J.; Bot, B. M.; Tejpar, S.; Delorenzi, M.; Goldberg, R. M.; Mahoney, M.; Sargent, D. J.; Alberts, S. R. 2015. Molecular Markers Identify Subtypes of Stage

III Colon Cancer Associated with Patient Outcomes. Gastroenterology, 148 (1): 88–99. DOI: 10.1053 / j.gastro.2014.09.041

(23) Smith, G.; Limite, R.; Wolf, H.; Steele, R. J.; Carey, F. A.; Wolf, C. R. 2010. Activating K-Ras mutations outwith ‘hotspot’ codons in sporadic colorectal tumours – implications for personalised cancer medicine. British Journal of Cancer, 102 (4): 693–703. DOI: 10.1038 / sj.bjc.6605534

(24) Stanisavljević, L.; Myklebust, M. P.; Leh, S.; Dahl, O. 2016. LGR5 and CD133 as prognostic and predictive markers for fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. Acta oncologica, 55 (12): 1425-1433.

(25) Watanabe, H.; Miki, C.; Okugawa, Y.; Toiyama, Y.; Inoue, Y.; Kusunoki, M. 2008. Decreased Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Predicts Poor Prognosis Following Curative Resection of Colorectal Cancer. Diseases Colon Rectum, 51 (12): 1867-1870. DOI: 10.1007 / s10350-008-9380-7

(26) Zeinalian, M.; Hashemzadeh-Chaleshtori, M.; Salehi, R.; Emami, M. H. 2018. Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. Adv Biomed Res, 7:28. DOI: 10.4103 / abr.abr\_185\_16

(27) Battaglin F.; Naseem, H.; Lenz, H. J.; Salem, M. E. 2018. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. Clin Adv Hematol Oncol, 16 (11): 735-745.

(28) Sargent, D. J.; Marsoni, S.; Monges, G.; Thibodeau, S. N.; Labianca, R.; Hamilton, S. R.; French, A. J.; Kabat, B.; Foster, N. R.; Torri, V.; Ribic, C.; Grothey, A.; Moore, M.; Zaniboni, A.; Seitz, J. F.; Sinicrope, F.; Gallinger, S. 2010. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol, 28, (20): 3219-26. DOI: 10.1200/JCO.2009.27

(29) Diehl, J. A. 2002. Cycling to Cancer with Cyclin D1. Cancer Biology Therapy, 1 (3): 226-231.

(30) Li, Z.; Jiao, X.; Wang, C.; Shirley, L.A.; Elsaleh, H.; Dahl, O.; Wang, M.; Soutoglou, E.; Knudsen, E. S.; Pestell, R. G. 2010. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. Cancer Res, 7, (2): 8802–8811. DOI: 10.1158 / 0008-5472.

(31) Berardi, R.; Morgese, F.; Onofri, A.; Mazzanti, P.; Pistelli, M.; Ballatore, Z.; Savini, A.; De Lisa, M.; Caramanti, M.; Rinaldi, S.; Pagliaretta, S.; Santoni, M.; Pierantoni, C.; Cascinu, S. 2013. Role of maspin in câncer. Clinical and Translational Medicine, 2 (1): 8. DOI: 10.1186/2001-1326-2-8.

- (32) Bodenshteyn, T.M.; Seftor, R. E.; Khalkhali-ELLIS, Z.; Seftor, E. A.; Pemberton, P, A.; Hendrix, M. J. 2012. Maspin: Molecular mechanisms and therapeutic implications. Cancer Metastasis, 31 (3-4): 529 – 51. DOI: 10.1007 / s10555-012-9361-0
- (33) Bergant, K.; Janezic, M.; Perdih, A. 2018. Bioassays and In Silico Methods in the Identification of Human DNA Topoisomerase II $\alpha$  Inhibitors. Curr Med Chem, 25 (28): 3286-3318.
- (34) Järvinen, T.A.; Liu, E. T. 2003. HER-2/neu and Topoisomerase II $\alpha$  – Simultaneous Drug Targets in Cancer. Combinatorial Chemistry High Throughput Screening, 6 (5): 455-70. DOI: 10.2174 / 0929867325666180306165725
- (35) Järvinen, T. A. H.; Tanner, M.; Rantanen, V.; Bärlund, M.; Borg, A.; Grénman, S.; Isola, J. 2000. Amplification and Deletion of Topoisomerase II $\alpha$  Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. Am. J. Pathol., 156 (3): 839-847.
- (36) Yarden, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. European Journal of Cancer, 37 (4): 3-8
- (37) De Luca, A.; Carotenuto, U. M.; Rachiglio, U. M.; Gallo, H.; Maiello, M.R.; Aldinucci, D.; Pinto, A.; Normanno, N. 2008. The Role of the EGFR Signaling in Tumor Microenvironment. J. Cell. Physiol, 214 (3): 559-67. DOI: 10.1002 / jcp.21260
- (38) Dong, Z.; Liu, L. H.; Han, B.; Pincheira, R.; Zhang, J. T. 2004. Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth. Oncogene, 23 (21): 3790-801. DOI: 10.1038 / sj.onc.1207465
- (39) Spratlin, J. L.; Cohen, R. B.; Eadens, M. L.; Gore, L.; Camidge, D. R.; Diab, S.; Leong, S.; O'bryant, C.; Chow, L. Q.; Serkova, N. J.; Meropol, N. J.; LEWIS, N. L.; Chórico, E. G.; Fox, F.; Youssoufian, H.; Rowinsky, E. K.; Eckhardt, S. G. 2010. Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor- 2. J Clin Oncol, 28 (5): 780-787. DOI: 10.1200 / JCO.2009
- (40) Funaki, H.; Nishimura, L.; Harada, S.; Ninomiya, I.; Terada, I.; Fushida, S.; Tani, T.; Fujimura, T.; Kayahara, H.; Shimizu, K.; Ohta, T.; Miwa, K. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. Oncology, 64 (4): 416-422.

- (41) Royston D.; Jackson D.G. 2009. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma. J Pathol, 217 (5): 608–619. DOI: 10.1002 / path.2517.
- (42) Li, P.; Lin J.E.; Chervoneva, I.; Schulz, S.; Waldman, S. A.; Pitari, G. M. 2007. Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine. Am J Pathol, 171 (6): 1847–1858.
- (43) Pilat, N.; Grünberger, T.; L, F.; Mittlböck, M.; Perisanidis, B.; Kappel, S.; Wolf, B.; Starlinger, P.; Kühner, I.; Mühlbacher, F.; Kandioler, D. 2015. Assessing the TP53 marker type in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for resectable colorectal liver metastases: A p53 Research Group study. EJSO, 41 (5): 683-689. DOI: 10.1016/j.ejso.2015.02.003
- (44) Liang, Z.; Wu, H.; Xia, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, K.; Wagar, N.; Yoon, Y.; Cho, H. T.; Scala, S.; Shim, H. 2010. Involvement of MiR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. Biochem. Pharmacol, 79 (6): 817- 824. DOI: 10.1016 / j.bcp.2009.10.017.
- (45) Goldstein, J.; Tran, B.; Ensemble, J.; Gibbs, P.; Wong, H. L.; Wong, S. F.; Vilar, E.; Gravata, J.; Broaddus, R.; Kopetz, S.; Desai, J.; Overman, M. J. 2014. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). Ann Oncol, 25 (5): 1032– 1038. DOI: 10.1093/annonc/mdu100.
- (46) Morkel, M.; Riemer, P.; Blaker, H.; Sers, C. 2015. Similar but different: Distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. Oncotarget, 6 (25): 20785-800.
- (47) Xu, J.; Li, D.; Ke, Z.; Liu, P.; Maubach, L.; Zhuo, L. 2009. Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Mol Med Report, 2 (5): 713–718. DOI: 10.3892/mmr\_00000161
- (48) Flannery, T.; Mcquaid, S; Mcgoohan, C.; Mcconnell, R. S.; MCgregor, G.; Mirakhur, M.; Hamilton, P.; Diamante, J.; Cran, G.; Walker, B.; Scott, C.; Martin, L.; Ellison, D.; Patel, C.; Nicholson, C.; Mendelow, D.; McCormick, D.; Johnston, P. G. 2006. Cathepsin S expression: an independent prognostic factor in glioblastoma tumours- A pilot study. Int J Cancer, 119 (4): 854–860.
- (49) Urun, Y. 2017. ERCC1 as a prognostic factor for survival in patients with advanced urothelial cancer treated with platinum based chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. Critical Reviews in Oncology / Hematology, 120: 120–126. DOI: 10.1016 / j.critrevonc.2017.10.012.

(50) Kassem, A. B.; Salem, S. E.; Abdelrahim, M. E.; Disse, A. S.; Salahuddin, A.; Hussein, M. M.; Bahnassy, A. A. 2017. ERCC1 and ERCC2 as predictive biomarkers to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients from Egypt. Exp Mol Pathol. 102 (1): 78-85. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.01.006.

# CURRENT DRUGS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES FOR THE LEISHMANIASIS TREATMENT

## *DROGAS ATUAIS E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE*

Monica Soares Costa, Débora Cristina de Oliveira Silva Nunes, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama

Federal University of Uberlândia. Av. Pará, 1720 - Bloco 2E - Bairro Umuarama.  
kelly.tudini@ufu.br

### ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease in 98 countries and 5 continents and approximately 1.3 million new cases occur annually. This work describes the main therapies used to treat the diverse clinical manifestations of leishmaniasis. Considering that the currently available anti-*Leishmania* drugs present several problems such as severe side effects and the possibility of parasitic resistance to the drug, among others, there is a constant search for new therapies for this disease. In addition to the drugs commonly used for the treatment of leishmaniasis, therapeutic alternatives such as metallic complexes were highlighted.

**Key words:** Treatment of Leishmaniasis; therapeutic alternatives; metallic complexes.

### RESUMO

A leishmaniose é endêmica em 98 países e 5 continentes e aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente. Neste trabalho estão descritas as principais terapias utilizadas para o tratamento das diversas manifestações clínicas da leishmaniose. Considerando que as drogas anti-*Leishmania* atualmente disponíveis apresentam vários problemas como graves efeitos colaterais e possibilidade de resistência parasitária ao medicamento, dentre outros, existe uma constante busca pelo desenvolvimento de novas terapias para essa doença. Além das moléculas comumente utilizadas no tratamento da leishmaniose, alternativas terapêuticas promissoras como os complexos metálicos foram destacadas.

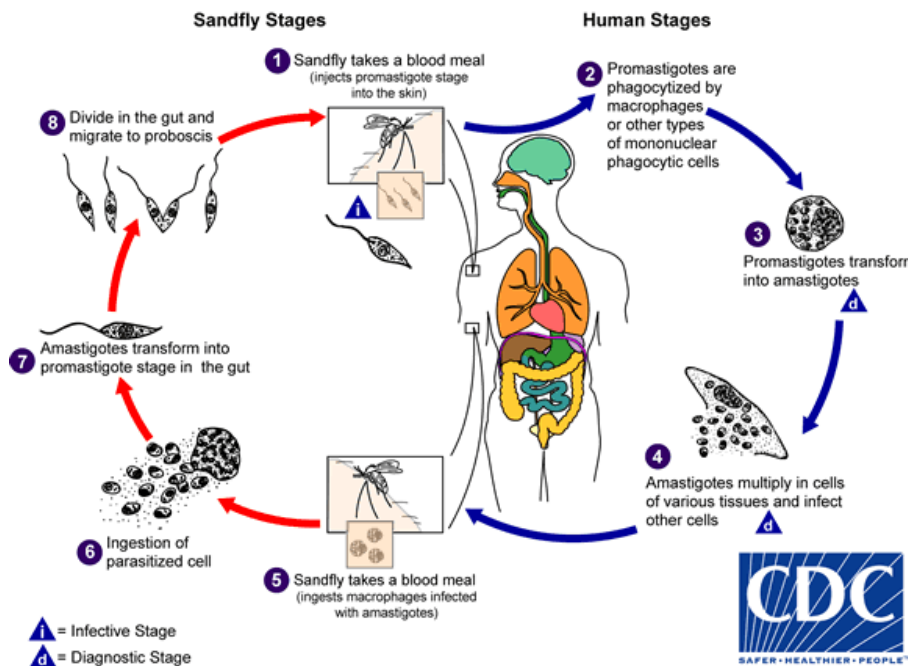
**Palavras-chave:** Tratamento de Leishmaniose; alternativas terapêuticas; complexos metálicos.

### INTRODUCTION

Leishmaniasis comprises a group of parasitic diseases caused by protozoa belonging to the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and *Leishmania* genus<sup>(1)</sup>. Its transmission occurs through the bite of females phlebotomine sand flies



infected with parasites (Figure 1), being possible the transmission of more than 21 species of *Leishmania* to man<sup>(2)</sup>. The various clinical manifestations of the disease depend on the *Leishmania* species involved in the infection, the immune status and the age of the affected patient. Thus, children and the elderly are more likely to present complications<sup>(3-4)</sup>. The disease can be classified as: Visceral Leishmaniasis (VL), a more severe clinical form of the disease that affects multiple organs, especially the liver and spleen, and when untreated it can be fatal<sup>(5)</sup>; and Tegumentar Leishmaniasis (TL; cutaneous, CL or mucocutaneous, MCL), which affects the skin and/or mucous membranes generating ulcers in different areas of the body and may result in permanent and disfiguring scars, with total or partial mutilation of the nasopharyngeal mucosa<sup>(2, 4,6-7)</sup>.



**Figure 1** – Life cycle of *Leishmania* parasites. Source: Public Health Image Library (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

According to the World Health Organization (WHO), 98 countries, 3 territories and 5 continents are endemic for leishmaniasis and approximately 1.3 million new cases occur annually. VL affects mainly regions such as Bangladesh,

Brazil, Ethiopia, India, Nepal, South Sudan and Sudan and it is related to the infection of approximately 300 thousand people annually, which can cause 20 to 50 thousand deaths. The TL related to the development of cutaneous form is more common in regions like Afghanistan, Algeria, Brazil, Colombia, Islamic Republic of Iran, Pakistan, Peru, Saudi Arabia, Syrian Arab Republic and Tunisia. The TL related to the development of the mucocutaneous form affects mostly Brazil, Peru and Plurinational State of Bolivia. Both TL (cutaneous and mucocutaneous) are associated with the infection of approximately 1 million people per year<sup>(3, 6, 8)</sup>.

Parasites of the *Leishmania* genus have been distributed in an expansive way in the last decades and, thus, the number of cases of the disease has increased exponentially. However, actual epidemiology is still unknown due to underreporting and lack of adequate epidemiological surveillance systems<sup>(8)</sup>. Furthermore, cases notification of this disease is mandatory in only 34% of endemic countries. In this way, most of data are based on estimates<sup>(8)</sup> and it is assumed that the actual values of leishmaniasis cases are higher than the data previously reported<sup>(9,10)</sup>.

The few drugs currently available for leishmaniasis treatment present several problems associated with side effects, cost, safety, increasing emergence of parasitic drug resistance, which limit their use<sup>(2)</sup>. To further aggravate this situation, unlike other diseases associated to deaths, which have the focus of attention and funding for research in developing countries, neglected tropical diseases, including leishmaniasis, comprise a category of infectious diseases with little investment to the search for new drugs and as well as for actions aimed at the control of the disease<sup>(4,11-13)</sup>. In this sense, the present work describes the main drugs associated with TL and VL treatments in Brazil, as well as the use of some promising molecules for the treatment of the disease, since they have an important anti-*Leishmania* activity.

## METHODOLOGY

The methodology used was a literature review, searching for specific information about the current drugs and new therapeutic approaches for leishmaniasis treatment.

## DEVELOPMENT

The choice of appropriate therapy for each clinical manifestation of leishmaniasis is based on some important criteria: <sup>(1)</sup> host factors such as genetics, immune response and clinical presentation of the disease; <sup>(2)</sup> treatment resources, such as quality of the drug, dosage, and duration and completion of the therapy; and <sup>(3)</sup> characteristics of the parasite, such as intrinsic sensitivity of the species and lack of resistance to the medication<sup>(2)</sup>. The following drugs are recommended by WHO as pharmacological treatment: pentavalent antimony, amphotericin B, pentamidine, miltefosine and paramomycin (Table 1).

### PENTAVALENT ANTIMONY

Pentavalent antimonials have been extensively used in leishmaniasis therapy and have been indicated as first choice drug since 1945 in several places in the world<sup>(14)</sup>. The first report on the use of antimonials in *Leishmania* was performed by Brazilian physician Gaspar Vianna, who showed the use of (Sb<sup>III</sup>) for the treatment of mucocutaneous leishmaniasis <sup>(15)</sup>. The anti-*Leishmania* activity was later confirmed also for visceral leishmaniasis in Italy and Africa <sup>(16 - 17)</sup>. However, due to the high toxicity produced by this drug, years later the pentavalent form of antimony (Sb<sup>V</sup>) was discovered and is used to date for the treatment of most leishmaniasis<sup>(18)</sup>.

Pentavalent antimonials are marketed as N-methylglucamine antimoniate (NMG) (trade name Glucantime®) in Latin America and Africa and as sodium stibogluconate (SGS) (trade name Pentostam®) in Europe and the United States <sup>5, 19)</sup>. Both present similar results for the treatment of clinical forms of American

tegumentary leishmaniasis (ATL), and this equivalent efficacy can be explained due to they belong to the same pharmacological class and have similar mechanism of action and pharmacokinetics<sup>(19)</sup>. In addition, they exhibit a low oral absorption, therefore their administration is by parenteral route (intramuscularly or intravenously)<sup>(18, 20)</sup>. Although antimonials have been used for more than 70 years to treat leishmaniasis, there are still important gaps concerning the precise mode these drugs action. Probably, it is related to multifactorial actions involving effect on molecular processes of the parasite and influence on the parasitocidal activity of macrophages<sup>(5)</sup>. Three hypothetical models are proposed regarding the action mechanism of these drugs:

- (1) The  $\text{Sb}^{\text{V}}$  behaves as a prodrug and undergoes biological reduction to a more active/toxic form,  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , which has leishmanicidal activity. However, the site and mechanism of reduction remain controversial since thiol compounds from both the mammalian host (glutathione) and the parasite (trypanothione) could be involved in the reduction of  $\text{Sb}^{\text{V}}$  to  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . Regardless of the reduction mechanism involved, trivalent antimony would promote the inhibition of trypanothione reductase, an enzyme that regenerates the reduced trypanothione, an important biomolecule for the metabolism of hydrogen peroxide in trypanosomatids. Furthermore,  $\text{Sb}^{\text{III}}$  could bind to proteins involved in DNA structure, replication and repair<sup>(21 - 22)</sup>.
- (2) The  $\text{Sb}^{\text{V}}$  has intrinsic anti-*Leishmania* activity. The drug would cause ATP depletion probably via inhibition of parasite glycolysis and  $\beta$ -oxidation. It has also been reported that  $\text{Sb}^{\text{V}}$  could form complexes with ribonucleosides, interfering in the purine metabolism<sup>(2, 22)</sup>.
- (3) Antimony acts in the macrophages activation, inducing the production of reactive oxygen species, nitric oxide and cytokines, which would culminate with the death of intracellular parasites<sup>(22)</sup>.

The main adverse effect of pentavalent antimonials is their action on the cardiovascular system causing cardiac arrhythmias, ventricular systole, tachycardia and fibrillation and changes in the electrocardiogram<sup>(14; 23)</sup>. Other adverse effects include arthralgia, myalgia, anorexia, nausea, vomiting, gastric fullness, abdominal

pain, pancreatitis, itch, fever, weakness, headache, dizziness, palpitation, insomnia, nervousness, edema, liver enzyme disorders and acute renal failure<sup>(23)</sup>. Moreover, antimonials are contraindicated in pregnant women, since the drug crosses the transplacental barrier and may lead to severe mental retardation syndromes. There are also restrictions on the use of the drug in patients over 50 years of age, who have cardiopathy, nephropathy, liver disease and Chagas ones<sup>(2)</sup>. Other limitations to the antimonials efficacy include an increase in drug parasite resistance<sup>(24)</sup> and its preferably parenteral route of administration, which makes the treatment expensive and difficult, especially in rural areas<sup>(24)</sup>.

In Brazil, the pentavalent antimony use as a first choice drug is recommended for both TL and VL. The recommended dose of pentavalent antimony ranges from 10 to 20 mg/kg/day over a period of 20 to 30 days, and the treatment time may be extended to some clinical forms of leishmaniasis<sup>(25 - 26)</sup>. In case of contraindication or unsatisfactory response to treatment, second-line drugs, described in the following, may be used.

#### AMPHOTERICIN B AND LIPOSOMAL AMPHOTERICIN B

Amphotericin B is a polyene antibiotic initially isolated from the microorganism *Streptomyces nodosus* in the 1950s with potent antifungal action. The first report of therapeutic success in the use of Amphotericin B in patients with leishmaniasis occurred in Brazil in 1963 with three individuals who presented the visceral form of the disease<sup>(27)</sup>.

It is a potent leishmanicide drug that presents selective toxicity by interfering with the esters (preferably ergosterol) of parasites cytoplasmic membrane forming pores that increase the permeability of the parasite membrane and promote an influx of ions. The change in ionic balance leads to the death of promastigotes and amastigotes<sup>(19, 24)</sup>. The Amphotericin B deoxycholate (AmBD) was first licensed in 1959 for use in fatal fungal infections.

Because of intravenous application and the high toxicity and extensive adverse effects caused by amphotericin B, new presentations of this drug has been developed including liposomal amphotericin B (AmBisome®; Gilead Sciences),

Amphotericin B lipid complex (ABLCcet®, Enzon Pharmaceuticals) and amphotericin B colloidal dispersion (ABCD; Amphotec™, Intermune Corp.) have been produced<sup>(28)</sup>. The liposomal amphotericin B is a pharmaceutical formulation in which amphotericin B is incorporated into liposomes containing phosphatidylcholine, cholesterol and distearylphosphatidylglycerol. In Brazil, the drug is registered in the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) for use in the treatment of visceral leishmaniasis, and it is considered an off-label drug for tegumentary leishmaniasis. The off-label use of any medicine can be performed at the risk of the prescribing physician. Literature data indicate the use of liposomal amphotericin B for TL treatment in cases in which all other therapeutic options have been contraindicated or used without success<sup>(29)</sup>.

Amphotericin B is commonly used for treatment of VL<sup>(23)</sup> and to treat leishmaniasis where antimony resistance is widespread. Its use has also been successful for the treatment of cutaneous leishmaniasis in the "New World" caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a species that is known to have high levels of antimony resistance. A study carried out in Bolivia with *L. (V.) braziliensis* showed that liposomal amphotericin B was more efficient (cure rate 85%), better tolerated, and more cost-effective than antimonials<sup>(30)</sup>. In Brazil, another study with infections mainly caused by *L. (V.) braziliensis* showed a cure rate of 81% and few side effects<sup>(31)</sup>. There is high variety of total treatment dosages and it shows that there is no consensus on the optimal dosage or schedule of application. Typically, liposomal amphotericin B is used in the dose of 2.5 – 5.0 mg/kg/day and the treatment periodicity depends on the clinical manifestation and the therapy (combination of drugs or use alone)<sup>(5, 7)</sup>. This formulation reduces the treatment total time by half when compared to the non-liposomal form<sup>(5)</sup>.

Serious adverse effects are related to the intravenous administration of amphotericin B, such as: fever, headache, nausea, vomiting, anorexia, tremors, chills, cyanosis, hypotension, hypopotassemia, hypomagnesemia, impaired renal function, behavioral disorders<sup>(5, 14, 24, 28)</sup>. Then, the drug is contraindicated for cardiac patients, hepatopathies and especially nephropathies. Furthermore, it

requires intravenous administration<sup>(28)</sup>. Liposomal amphotericin B also has limitations, such as high cost and renal toxicity<sup>(5, 32)</sup>.

## PENTAMIDINE

Pentamidine, an aromatic diamine, was originally used for the treatment of African trypanosomiasis<sup>(33 - 34)</sup>. Its first use for the treatment of VL was reported in 1949 in India and in 1950 in Spain<sup>(35 - 36)</sup> and since then it has been used as a second-choice drug for the treatment of CL in endemic areas of the American, Asian and African continents. Pentamidines are marketed for human use as Isethionate (di-B-hydroxyethane sulfonate) and Mesylate (di-B-hydroxymethylsulfonate) formulations<sup>(37)</sup> with the following trade names 'Pentacrinat' and 'Pentam'<sup>(5)</sup>.

It is known that pentamidines interfere with glucose metabolism. The drug can induce cytolysis of  $\beta$ -pancreatic cells and, consequently, insulin-dependent diabetes<sup>(2)</sup>. In Brazil, the pentamidine has been used as a second-choice drug for the treatment of TL/VL<sup>(38)</sup>. The drug has also been used as first choice for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana and Suriname<sup>(39)</sup>.

The most frequent adverse reactions are pain, induration and sterile abscesses at the site of application, as well as nausea, vomiting, dizziness, myalgia, headache, hypotension, syncope, hypoglycemia and hyperglycaemia<sup>(5, 23)</sup>. There is contraindication to use in case of gestation, diabetes, renal and hepatic insufficiency, heart disease and for children weighing less than 48 kg<sup>(2)</sup>.

Few studies using pentamidine as a therapy for ATL were conducted in the Americas. Classically, the recommended dose is 4.0 mg/kg/day, by deep intramuscular route, every two days and it is not recommended to exceed the total dose of 2.0 g<sup>(29)</sup>. For the treatment of CL caused by *L. (V.) guyanensis* and *Leishmania (Viannia) panamensis* in South America, the 4.0 mg/kg dose has been used for 3 – 5 days, intravenously<sup>(40)</sup>. In Brazil, the *L. (V.) braziliensis* infection treated at a dose of 4.0 mg/kg/day on alternate days for one week resulted in healing of 71% of patients<sup>(37)</sup>.

## MILTEFOSINE

Originally investigated as an antineoplastic agent, the miltefosine had the leishmanicidal action tested in 1996 when its *in vitro* activity against *Leishmania (Leishmania) donovani* amastigote forms and later against *Trypanosoma cruzi* was verified<sup>(32,41)</sup>. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) is derived from alkyllysophospholipids and it is available under the trade names Impavido® and Miltex®<sup>(5)</sup>.

The mode the drug works in *Leishmania* is still not well understood. However, it is believed the mechanism of action is similar to that of tumor cells, involving apoptosis and disruption of the lipid-dependent cell signaling pathway<sup>(42)</sup>.

Miltefosine has been shown to have good results, mainly for oral TL treatment, since it has a low toxicity when compared to antimonials<sup>(43)</sup>. The drug is also used as a second-choice for the treatment of VL in some countries<sup>(32)</sup>. As the drug is very well tolerated, the main adverse effects include nausea and vomiting. Limitations for the use of miltefosine include its relatively high cost, need for monitoring of gastrointestinal side effects and occasionally liver and nephrotoxicity. In addition, it is a teratogenic agent and therefore contraindicated for pregnant women<sup>(2,5,23)</sup>.

Miltefosine has been used for the treatment of "New World" cutaneous leishmaniasis caused by several species and different levels of efficacy were observed<sup>(44)</sup>. In the "New World" CL caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) panamensis*, the drug is effective at 2.5 mg/kg/day dose for 28 days, but is not effective for the treatment of *L. (V.) braziliensis* infections<sup>(5,23)</sup>. Bolivian CML responded to treatment with miltefosine for 4 – 6 weeks, with a cure rate of up to 75%<sup>(45)</sup>.

## PARAMOMYCIN

It is a broad spectrum aminoglycoside antibiotic isolated from the *Streptomyces krestomuceticus* bacterium, which blocks proteins synthesis due to the binding to ribosomal RNA<sup>(32)</sup>. It has been used in topical and parenteral formulations for the treatment of CL, but its systemic use is rare<sup>(23)</sup>. Data on the use of paramomycin are

fundamentally limited to its topical use because the lack of knowledge about its efficacy when administered parenterally<sup>(44)</sup>.

Local adverse effects associated with the use of paramomycin in topical formulation include itch, rash, and burning<sup>(20)</sup>. Adverse effects due to systemic use include ototoxicity, vestibular instability, and nephrotoxicity<sup>(5,19)</sup>.

**Table 1 – Drugs used to treat leishmaniasis.**

Drug	Structure	Trade names	Current situation	Adverse effects
Antimony	(47)	Glucantime® (* N-methylglucamine antimoniate) Pentostan® (*Sodium stibogluconate)	First-choice drug for VL and TL	Cardiotoxicity; nephrotoxicity and hepatotoxicity
Amphotericin B	(48)	Anforicin B®, Anfolip B®, Abelcet®, Funtex B®, Unianf®, Amphocil®	Second-choice drug for VL and TL	Hypopasemia; anorexia; renal insufficiency; anemia; leucopenia and cardiac changes
Liposomal Amphotericin B	(47)	Ambisome®	Restricted use for cases where other therapies have not shown therapeutic success	Renal toxicity
Pentamidine	(49)	Fauldpenta® Pentacarinat®	Second-choice drug for VL and TL.	Hypoglycemia; hyperglycemia; nausea and vomiting and hypotension
Miltefosine	(47)	Milteforan® Miltex®	Second-choice drug for VL and TL.	Nausea and vomiting and casionally nephrotoxicity and hepatotoxicity
Paramomycin	(47)	Humatin®	Second-choice drug for TL.	Pruritus; rash; ototoxicity and nephrotoxicity

Paramomycin is available in several topical formulations, which have shown variable results for CL. Topical treatment for CL in the "New World" consists of 15% paramomycin ointment with 12% methyl benzethonium chloride applied once daily for 20 days<sup>(19,24)</sup>. Methyl benzethonium acts as a skin penetration

facilitating agent<sup>(19)</sup>. The topical formulation is easy to administrate and its side effects include itch, burning and vesicles formation<sup>(24)</sup>. The combination of paramomycin with gentamicin has also been used<sup>(19)</sup>. The systemic use at 20 mg/kg/day dose for 20 days showed an excellent cure rate (greater than 90% ) in Brazil<sup>(46)</sup>.

#### OTHER THERAPEUTIC APPROACHES – POTENTIAL OF METAL COMPLEXES: RUTHENIUM COMPLEXES

Bioinorganic chemistry reached its milestone in the 1960s through studies by Rosenberg and colleagues, which described the antitumor properties exhibited by *cis*-platinum, a Pt (III) complex<sup>(50)</sup>. The success of cisplatin triggered an intense search for metalloproteinases that had biological activity. Thus, several studies have shown the use of metallic complexes in different pathologies such as cancer<sup>(51-52)</sup>, cardiovascular problems<sup>(53)</sup> and parasitic diseases<sup>(54 - 56)</sup>.

There are similarities between protozoa of the Trypanosomatidae family and tumor cells, since both present highly proliferative cells, thus requiring a great demand of nutrients. Considering that many antitumor drugs are based on preclusion of obtaining nutrients or generating enough energy for this high metabolic demand, chemotherapeutic agents are expected to present action against protozoan trypanosomatids, such as *Leishmania*<sup>(57)</sup>.

The first reports involving the application of metallic complexes in parasitic diseases caused by trypanosomatids were performed by Williamson and Farrell, who verified the *in vitro* activity of *cis*-platin complexes against *Trypanosoma rhodesiense*<sup>(58-59)</sup>. Several attempts to develop metallodrugs with antiparasitic action are underway and take into account some strategies<sup>(60-61)</sup>, such as: (I) inclusion of a metallic center in the antiparasitic drug structure to promote an increase in pharmacological properties due to a synergistic action between drug and metal, through multiple mechanisms of action; (II) coordination of the metal with DNA intercalators to promote inhibition of parasite multiplication; and (III) coordination of the metal with binders or inhibitors that specifically act on parasitic enzymes allowing the targeting of the metal to the parasite in a selective way.

The Ruthenium (Ru) is a transition metal and, like platinum, presents different stages of oxidation: Ru (II), Ru (III) and Ru (IV). Some ruthenium complexes are already in clinical screening for cancer therapy<sup>(62-63)</sup>. The pioneering work of Sanchez-Delgado, more than 20 years ago, represented the starting point for the use of ruthenium complexes as metallodrugs for the parasitic infections treatment<sup>(54)</sup>.

The intent of the study was to elucidate the synergism between drug and metal and the multiplicity of pharmacological targets. In this sense, ruthenium complexes coordinated with clotrimazole (CTZ) – [RuCl<sub>2</sub>(CTZ)<sub>2</sub>] and subsequently with ketoconazole (KTZ) drugs were developed<sup>(54, 64)</sup>. CTZ and KTZ are antifungal drugs that act by inhibiting the sterol biosynthesis pathway and also exhibit moderate activity against trypanosomatids. [RuCl<sub>2</sub>(CTZ)<sub>2</sub>] showed a 10-fold more potent *in vitro* activity against *T. cruzi* when compared to the free CTZ action<sup>(54)</sup>.

Furthermore, in relation to the targets multiplicity hypothesis, it was determined that binding of [RuCl<sub>2</sub>(CTZ)<sub>2</sub>] to DNA would promote the release of CTZ, which would present its classical action in the biosynthesis pathway of sterols<sup>(54,65-66)</sup>. Ruthenium complexes coordinated with CTZ also showed synergism in *Leishmania*. *In vitro* studies showed that 8 CTZ-associated complexes exhibited toxicity against *Leishmania (Leishmania) major* promastigote forms and that this action was remarkably superior to free CTZ activity. Another study showed the coordination of ruthenium complexes with lapachol, which has antitumor and antimicrobicide action, resulted in complexes with anti-*Leishmania* (promastigote and intracellular amastigote) activity more potent than free lapachol<sup>(56)</sup>. Activity against trypanosomatids data, obtained with the ruthenium complexes associated to drugs, confirm the synergistic action between the metal and the drug and highlight the therapeutic potential of these metallic complexes.

A remarkable anti-*Leishmania* activity has recently been described by Costa and colleagues (2017) for the use of new ruthenium (II) complexes against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum* species. Such complexes, referred to as complex 1 – cis-

[Ru<sup>II</sup>( $\eta^2$ -O<sub>2</sub>CC<sub>10</sub>H<sub>13</sub>) (dppm)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub>, complex 2 – cis-[Ru<sup>II</sup>( $\eta^2$ -O<sub>2</sub>CC<sub>7</sub>H<sub>7</sub>S) (dppm)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub> and complex 3 – cis-[Ru<sup>II</sup>( $\eta^2$ -O<sub>2</sub>CC<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>)(dppm)<sub>2</sub>] PF<sub>6</sub>, exhibited potent cytotoxic activity against promastigotes of the three species analyzed, presenting IC<sub>50</sub> values ranging from 0.52 – 12.49  $\mu$ M.

Additionally, the effect of ruthenium complexes on the parasite-host interaction was verified by the infectivity test performed on RAW 264.7 macrophages, using two different concentrations: (1) cytotoxic concentration for 50% of promastigotes (IC<sub>50</sub>) and (2) non-toxic concentration to 90% of macrophages. Complexes **1** – **3** at both concentrations tested were able to significantly reduce the infectivity index (37 – 87%) for all species of *Leishmania* analyzed. Interestingly, there was no statistically significant difference between the concentrations tested, except for complex **1** against the *L. (L.) infantum* species<sup>(67)</sup>.

The antiproliferative activity of novel ruthenium complexes associated with purine analogues, 5,6,7-trimethyl-1,2,4-triazolo [1,5-a] pyrimidine (tntp): cis, fac-[RuCl<sub>2</sub> ( dmsO)<sub>3</sub> (tntp)] (complex 1), mer-[RuCl<sub>3</sub>(dmsO)(H<sub>2</sub>O)(tntp)]•2H<sub>2</sub>O (complex 2) and fac,cis- [RuCl<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>O) (tntp)<sub>2</sub>] (complex 3) was recently reported against *Leishmania* spp (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) donovani* and *L. (L.) infantum*) promastigote and *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. Complexes **1** – **3** exhibited IC<sub>50</sub> values ranging from 9.2 – 202.5  $\mu$ M for different *Leishmania* promastigote forms analyzed and 32.4 – 51.5  $\mu$ M for the epimastigote form of *T. cruzi*<sup>(68)</sup>.

The *in vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of nitrosyl complex (cis[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)](PF<sub>6</sub>) was recently evaluated against *L. (V.) braziliensis*. *In vitro*, low concentrations of the complex were able to significantly decrease the cellular infection after 24h of treatment, leading to a total reduction of infectivity with the use of 50  $\mu$ M of the complex. In the *in vivo* infection model, the daily treatment with 300  $\mu$ g/ kg/day of the complex was able to reduce the size of the lesion in a significant way (51%), eliminating almost all (99.9%) the parasites found in the lymph nodes<sup>(69)</sup>.

The mechanism of death involved in the action of a drug has been increasingly explored, since its knowledge enables a better understanding of the cellular response involved, configuring an important tool for the prospection of new therapeutic agents. Recently, Costa and colleagues (2019) demonstrated the mechanism of death involved in the action of the complex of ruthenium called hmxbato (*cis*-[RuII( $\eta^2$ -O<sub>2</sub>CC<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>) against *L. (L.) amazonensis* promastigotes. The complex was able to induce death by apoptosis, which was demonstrated by the following changes: (1) depolarization of the mitochondrial membrane, (2) increase in reactive oxygen species production, (3) DNA fragmentation, (4) formation of to pre-apoptotic peak, (5) alterations in parasite morphology and (6) formation of autophagic vacuoles<sup>(70)</sup>.

Taken together, these results show that ruthenium complexes may be considered excellent candidates for the new pharmacological targets prospection against *Leishmania* parasites. Although promising, there are few studies demonstrating the probable mechanism of parasite death. Then, new studies will be needed aiming at elucidation of the promising potential of ruthenium complexes for the treatment of leishmaniasis.

#### FINAL CONSIDERATIONS

The present work describes the main therapies used to treat the various clinical manifestations of leishmaniasis. Given that the anti-*Leishmania* drugs available are often associated with problems as serious side effects and the possibility of parasitic drug resistance, there is an intense search for the development of new therapies for this disease. Some therapeutic alternatives and new molecules with anti-*Leishmania* activity were also highlighted.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Institute of Biology of the Federal University of Uberlândia for the support provided to carry out our research.

## REFERENCES

- (1) Lainson, R.; Shaw, J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. eds. *The leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. London: Academic Press. 1987, 1120 p.
- (2) Anversa, L.; Tiburcio, M. G. S.; Richini-Pereira, V. B.; Ramirez, L. E. 2018. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 64(3): 281-289.
- (3) Von Stebut, E. 2015. Leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 13: 191-201.
- (4) Sunyoto, T.; Boelaert, M.; Meheus, F. 2019. Understanding the economic impact of leishmaniasis on households in endemic countries: a systematic review. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17: 57-69.
- (5) Mcgwire, B. S.; Satoskar, A. R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *International Journal of Medicine*, 107: 7-14.
- (6) Bi, K.; Chen, Y.; Zhao, S.; Kuang, Y.; Wu, C. H. J. 2018. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. *BioMed Research International*, 2018: 1-13.
- (7) Mosimann, V.; Neumayr, A.; Paris, D. H.; Blum, J. 2018. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. *Acta Tropica*, 182: 246-250.
- (8) Pace, D. Leishmaniasis. 2014. *Journal of infection*, 69: 510-518.
- (9) Aagaard-Hansen, J.; Nombela, N.; Alvar, J. 2010. Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. *Tropical Medicine & International Health*, 15(11): 1281-1218.
- (10) Argaw, D.; Mulugeta, A.; Herreo, M.; Nombela, N.; Teklu, T.; Tefera, T.; Zewdu, B.; Alvar, J.; Bern, C. 2013. Risk factors for visceral leishmaniasis among residents and migrants in Kaft a-Humera, Ethiopia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(11): 1-9.
- (11) Lindoso, J. A. L.; Lindoso, A. A. B. P. 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(5): 247-253.
- (12) Sarteriale, A.; Bessoff, K.; Sarkar, I. N.; Huston, C. D. 2014. Drug repurposing: mining protozoan proteomes for targets of known bioactive compounds. *The Journal of American Medical Informatics Association*, 21: 238-244.

- (13) Vias, S. J.; Stolk, W. A.; Rutte, E. A.; Hontelez, J. A. C.; Bakker, R.; Blok, D. J.; Cai, R.; Houweling, T. A. J.; Kulik, M. C.; Lenk, E. J.; Luyendijk, M.; Matthijsse, S. M.; Redecop, W. K.; Wagenaar, I.; Jacobson, J.; Nagelkerke, N. J. D.; Richardus, J. H. 2016. Concerted efforts to control or eliminate neglected tropical diseases: how much health will be gained? Plos Neglected Tropical Diseases, 10(2).
- (14) Rama, M.; Kumar, N. V. A.; Balaji, S. 2015. A comprehensive review of patented antileishmanial agents. Pharmaceutical Patent Analyst, 4(1): 37-56.
- (15) Vianna, G. 1912. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. Arquivo Brasileiro de Medicina, 2: 426.
- (16) Di Cristina, G; Caronia, G. 1915. “Sulla terapia della leishmaniosis interna. Pathologica, 7: 82-83.
- (17) Cole, A.C.E. 1944. Kala-azar in east Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 37: 409-435.
- (18) Rath, S; Trivelin, L. A; Imbrunito, T. R; Tomazela, D. M; de Jesus, M. N; Marzal, P. C; Junior, H. F. A; Tempene, A.G. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova, 6(4): 550-555.
- (19) Lima, E. B.; Motta, J. O. C.; Porto, C.; Sampaio, R. N. R. 2007. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Anais Brasileiros de Dermatologia, 82(2): 111-124.
- (20) Balaña-Fource, R.; Reguera, R. M.; Cubría, J. C.; Ordóñez, D. 1998. The pharmacology of leishmaniasis. General Pharmacology, 30(4): 435-443.
- (21) Turrens, J. F. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine, 25: 211-220.
- (22) Haldar, A. K.; Sen, P.; Roy, S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. Molecular Biology International, 2011: 1-23.
- (23) Sundar, S.; Chakravarty, J. 2015. An update oh pharmacotherapy for leishmaniasis. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 16(2): 237-252.
- (24) Handler, M. Z.; Patel, P. A.; Kapila, R.; Al-Qubati, Y.; Schwartz, R. A. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management. Journal of the American Academy of Dermatology, 73(6): 911-926.

- (25) Herwaldt, B. L.; Berman, J. D. 1992. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 46(3): 296-306.
- (26) Abramowicz, M. 1993. Drugs for parasitic infections. The Medical letter on drugs and therapeutics, 1993(33): 111-122.
- (27) Prata, A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. 1963. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 57(4): 266-268.
- (28) Andrews, K. T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. 2014. International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance, 4: 95-111.
- (29) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013.
- (30) Solomon, M. P. F.; Barzilai, A.; Schwartz, E. 2013. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. Journal of the American Academy of Dermatology, 68(2): 284-289.
- (31) Motta, J. O.; Sampaio, R. N. 2012. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 26: 331-335.
- (32) Nagle, A. S.; Khare, S.; Kumar, A. B.; Supek, F.; Buchynskyy.; Mathison, C. J.; Chennamaneni, N. K.; Pendem, N.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H.; Molteni, V. 2014. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. Chemical Reviews, 26(114): 11305-11347.
- (33) Lourie, E. M.; Orke, W. 1939. Studies in chemotherapy. XXI. The trypanocidal action of Certain aromatic diamidines. Annals of Tropical Medicine Parasitology, 33: 289-304.
- (34) Lourie, E. M. 1942. Treatment of sleeping sickness in Sierra Leone. Annals of Tropical Medicine Parasitology, 36: 113-131.
- (35) Hazarika, A. N. 1949. Treatment of kala-azar with pentamidine isothionate; a study of 55 cases. The Indian Medical Gazette, 84(4): 140-145.

- (36) Martínez, A.; Carreon, T.; Iniguez, E.; Anzelotti, A.; Sánchez, A.; Tyan, M.; Sattler, A.; Herrera, L.; Maldonado, R. A.; Sáchez-Delgado, R. A. 2012. Searching for new chemotherapies for tropical diseases: Ruthenium – Clotrimazole complexes display high *in vitro* activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward normal mammalian cells. Journal of Medicinal Chemistry, 55: 3867-3877.
- (37) de Paula, C. D.; Sampaio, J. H.; Cardoso, D. R.; Sampaio, R. N. 2003. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(3): 365-371.
- (38) Mitropoulos, P.; Konidas, P.; Durkin-Konidas, M. 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology, 63(2): 309-322.
- (39) Roussel, M; Nacher, M; Fremont, G; Roturneau, B; Clyti, E; Sainte-Marie, D; Carme, B; Pradinaud, R; Couppie, P. 2006. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. Annals of Tropical Medicine and Public Health, 100(4): 307-314.
- (40) Hellier, I.; Dereure, O.; Tournillac, I.; Pratlong, F.; Guillot, B.; Dedet, J. P.; Guilhou, J. J. 2000. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis by pentamidine isethionate. An open study of 11 patients. Dermatology, 200(2): 120-12.
- (41) Croft, S. L.; Snowdon, D.; Yardley, V. 1996. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 38(6): 1041-1047.
- (42) Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K. 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 5(6): 485-497.
- (43) Machado, P. R.; Ampuero, J.; Guimarães, L. H.; Villasboas, L.; Rocha, A. T.; Schriefer, A.; Souza, R. S.; Talhari, A.; Penna, G.; Carvalho, E. M. 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. PLOS Neglected Tropical Diseases, 21(4): 1-6.
- (44) Monge-Maillo, B.; López-Vélez, R. 2013. Therapeutic options for Old World cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Drugs, 73: 1889-1920.

- (45) Soto, J.; Rea, J.; Valderrama, M.; Toledo, J.; Valda, L.; Ardiles, J.; Berman, J. 2009. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 81: 387-379.
- (46) Correia, D.; Macedo, V. O.; Carvalho, E. M.; Barral, A.; Magalhaes, A. V.; de Abreu, M. V.; Orge, M. L., Marsden, P. 1996. Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulphate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29(5): 447-453.
- (47) Burrows, J. N.; Elliott, R. L.; Kaneko, T.; Mowbray C. E. Waterson, D. 2014. The role of modern drug discovery in the fight against neglected and tropical diseases. Medicinal Chemistry Communications, 5: 688-700.
- (48) Falci, D. R.; Pasqualotto, A. C. 2015. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. Clinical & Biomedical Research, 35(2): 65-82.
- (49) Dorlo, T. P. C.; Kager, P. A. 2008. Pentamidine dosage: a base/salt confusion. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2(5): 1- 3.
- (50) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. Nature, 205: 698-699.
- (51) Komeda, S.; Casini, A. 2012. Next-Generation Anticancer Metallodrugs. Current Topics in Medicinal Chemistry, 12(3): 219-235.
- (52) Pereira, F. C; Lima, B. A. V; de Lima, A. P; Pires, W. C; Monteiro, T; Magalhaes, L. F; Costa, W; Graminha, A. E; Batista, A. A, Ellena, J; Silveira-Lacerda, E. P. 2015. Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF<sub>6</sub> complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). Journal of Inorganic Biochemistry, 149: 91-101.
- (53) Bates, J. N; Baker, M. T; Guerra, R; HÁRRISON, D. G. 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue: Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochemical Pharmacology, 42(1): 157-165.

- (54) Sánchez-Delgado, R. A.; Lazard, K.; Rincón, L.; Urbina, J. A. 1993. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in  $\text{RuCl}_2(\text{clotrimazole})_2$ . Journal of Medicinal Chemistry, 36(14): 2041-2043.
- (55) Martínez García, P.; Guasch, J.; Llauro, F. 1950. First cases of infantile kala-azar treated in Spain with diamidines (stilbamidine and pentamidine). Revista Española Pediatría, 6(3): 319-346.
- (56) Barbosa, M. I.; Correa, R. S.; DE Oliveira, K. M.; Rodrigues, C.; Ellena, J.; Nascimento, O. R.; Rocha, V. P.; Nonato, F. R.; Macedo, T. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Soares, M.B.; Batista, A. A. 2014. Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. Journal of Inorganic Biochemistry, 136: 33-39.
- (57) Borst, P. 1977. Metabolism and chemotherapy of African trypanosomes, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 71: 3-4.
- (58) Farrell, N. P.; Williamson, J.; McLaren, D. J. M. 1984. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. Biochemical Pharmacology, 33: 961-971.
- (59) Farrell, N. P. Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1989.
- (60) Navarro, M.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Gambino, D. 2010. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. Drug Discovery Today, 15: 1070-1078.
- (61) Gambino, D.; Otero, L. 2012. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. Inorganica Chimica Acta, 393: 103-114.
- (62) Bratsos, I.; Jedner, S.; Gianferrara, T.; Alessio, E. 2007. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. International Journal of Chemistry, 61: 692-697.
- (63) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessi, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. 2008. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. Chemistry & Biodiversity, 5(10): 2140-2155.
- (64) Sánchez-Delgado, R. A.; Anzellotti, A. 2004. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 4(1): 23-30.

- (65) Sánchez-Delgado, R. A.; Navarro, M.; Lazard, K.; Atencio, R.; Capparelli, M.; Vargas, F.; Urbina, J. A.; Bouillez, A.; Noels, A. F.; Masi, D. 1998. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. Inorganica Chimica Acta, 275-276.
- (66) Navarro, M.; Lehmann, T. E.; Cisneros-Farjado, E. J.; Fuentes, A.; Sánchez-Delgado, R. A.; Silva, P.; Urbina, J. A. 2000. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases. Synthesis and characterization of new Ru(II) and Ru(III) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma Cruzi*. Polyhedron, 19: 2319-2325.
- (67) Costa, M. S.; Gonçalves, Y. G.; Nunes, D. C. O.; Napolitano, D. R.; Maia, P. I. S.; Rodrigues, R. S.; Rodrigues, V. M.; Von Poelhsitz, G.; Yoneyama, K. A. G. 2017. Anti- *Leishmania* activity of new ruthenium(II) complexes: Effect on parasite-host interaction. Journal of Inorganic Biochemistry, 175: 225-231.
- (68) Frandzloch, M.; Arriaga, J. M. M.; Sánchez-Moreno, M.; Wojtczak, A.; Jezierska, J.; Sitkowski, J.; Wisniewska, J.; Salas, J.M.; Lakomska, I. 2017. Strategies of overcoming tropical disease by Ruthenium Complexes with purine analog: application against *leishmania spp* and *Trypanosoma cruzi*. Journal of Inorganic Biochemistry, 176: 144-155.
- (69) Do Nascimento, N. R. F.; De Aguiar, F. L. N. Santos, C.F., Costa, A. M. L., Haridoim, D. J., Calabrese, K. S., Almeida-Souza, F., De Sousa, E. H. S., Lopes, L. G. F., Teixeira, M. J., Pereira, V.S., Brilhante, R. S. N., Rocha, M. F. G. 2019. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Acta Tropica, 192: 61 – 65.
- (70) Costa, M.S., Gonçalves, Y.G., Teixeira, S.C., Nunes, D. C. O., Lopes, D. S., Da Silva, C. V., Da Silva, M. S., Borges, B. C., Silva, M. J. B., Rodrigues, R. S., Rodrigues, V. M., Von Poelhsitz, G., Yoneyama, K, A. G. 2019. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-*Leishmania* activity of a potent ruthenium(II) complex. Journal of Inorganic Biochemistry, 195: 1-12.

# FARMACOTERAPIA DE PACIENTES PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA NA REGIÃO BRASIL CENTRAL

## *PHARMACOTHERAPY OF PATIENTS WITH SYSTEMIC ARTERIAL HYPERTENSION IN CENTRAL BRAZIL REGION*

**Bruno Vinícius Diniz e Silva, Lorena Neves Ferreira, Jéssica Barletto de Sousa Barros, Rodrigo da Silva Santos, Angela Adamski da Silva Reis\***

Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Patologia Molecular. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. CEP: 74690-900 angeladamski@gmail.com

### RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada pelo aumento dos níveis pressóricos e por isso é considerada um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim, uma das principais formas de prevenção das complicações cardiovasculares relaciona-se ao controle da hipertensão arterial, que pode ser realizado através de mudanças no estilo de vida, bem como pela utilização de medicamentos anti-hipertensivos. Avaliar aspectos farmacológicos referentes à terapêutica da HAS, com ênfase na elucidação dos principais medicamentos indicados para seu controle. Trata-se de um estudo transversal de base hospitalar, realizado através da análise de prontuários de pacientes hipertensos sob o tratamento no Serviço de Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO, Brasil. A população estudada foi constituída de 113 indivíduos, 33 homens (29%) e 80 mulheres (71%) e apresentou idade média de 55,6 anos. Além disso, foi possível observar que os diuréticos tiazídicos foram os mais prescritos para o tratamento da hipertensão (74%), e que dentre esses houve uma maior prevalência da hidroclorotiazida (47%). A eficácia terapêutica dos diuréticos tiazídicos, seus efeitos adversos bem tolerados e seu baixo custo, podem ser considerados como os principais fatores que possivelmente justifiquem sua taxa de prescrição.

**Palavras- Chave:** Anti-Hipertensivos, Diuréticos Tiazídicos, Hidroclorotiazida.

### ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is characterized by increased of the blood pressure levels and therefore it's considered one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases. Thus, one of the main ways of preventing cardiovascular complications is related to the control of arterial hypertension, which can be accomplished through changes in lifestyle, as well as the use of antihypertensive drugs. Evaluate pharmacological aspects related to the treatment of hypertension, with emphasis on the elucidation of the main drugs indicated for its control. This is a cross-sectional hospital study, based on the analysis of medical records of hypertensive patients undergoing treatment at the Clinical Service of the

Clinical Hospital of the Federal University of Goiás - Goiânia, GO, Brazil. The study population was constituted by 113 individuals, 33 men (29%) and 80 women (71%), and presented an age mean of 55.6 years. In addition, it was possible to observe that thiazide diuretics were the most prescribed for the treatment of hypertension (74%), and among them there was a higher prevalence of hydrochlorothiazide (47%). The therapeutic efficacy of thiazide diuretics, their well-tolerated adverse effects and their low cost, can be considered as the main factors that may justify their prescribing rate.

**Keywords:** Antihypertensives, Thiazidediuretics, Hydrochlorothiazide.

## INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é definida como um quadro clínico multifatorial caracterizado pelo aumento crônico dos níveis pressóricos,  $\geq 140$  e/ou 90 mmHg. Nesses níveis, a HAS está relacionada a diversos distúrbios metabólicos e funcionais em órgãos-alvo, sendo um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Dados da 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, indicam que no Brasil existem 36 milhões de indivíduos hipertensos (32,5% da população), e que a HAS é responsável por 50% dos óbitos por DCV<sup>1,2</sup>.

As doenças cardiovasculares são conceituadas como um grupo de doenças que envolvem alterações do sistema cardiovascular e dos vasos sanguíneos. Essas estão relacionadas principalmente a aterosclerose, que é a deposição contínua de placas de gorduras nos vasos sanguíneos, formando assim coágulos que promovem quadros de isquemia. Desta forma, mediante ao bloqueio de vasos cardíacos ocorre o infarto agudo do miocárdio (IAM), e diante da oclusão dos vasos cerebrais, acontece o acidente vascular cerebral (AVC)<sup>3,4</sup>.

A HAS é um fator predisponente para as DCV, pois o aumento dos níveis pressóricos propicia o estiramento excessivo da parede dos vasos sanguíneos, o que por sua vez promove o desenvolvimento de lesões endoteliais. Assim, a fim de reparar essas lesões, uma série de reações ocorrem na parede endotelial vascular, como o aumento da ativação plaquetária, síntese de quimiocinas, citocinas, expressão de moléculas de adesão, proliferação de células musculares lisas, bem

como uma maior aderência de leucócitos e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Todo esse processo propicia a formação de placas ateroscleróticas, que são os fatores favoráveis para o desenvolvimento das DCV<sup>5,6</sup>.

Assim, uma das principais formas de prevenção para as doenças cardiovasculares relaciona-se ao controle dos níveis pressóricos, e por isso diversas medidas já foram estabelecidas para o tratamento da HAS. Essas envolvem desde mudanças nos hábitos de vida, como uma alimentação equilibrada, prática periódica de exercícios físicos, controle do peso corporal, abstinência do tabagismo e do etilismo, diminuição do estresse bem como, em última instância envolve a associação de medicamentos anti-hipertensivos<sup>(1)</sup>.

Os medicamentos anti-hipertensivos têm demonstrado uma atuação fundamental na diminuição dos níveis pressóricos e da morbimortalidade cardiovascular, proporcionando ainda, melhora no bem-estar dos pacientes<sup>7,8</sup>. Assim, a adesão inadequada ao tratamento ou o abandono das medicações pelos indivíduos hipertensos, propicia uma maior quantidade de internações hospitalares e diminuição da qualidade de vida do paciente, bem como reflete no aumento dos gastos públicos destinados ao tratamento, e na redução da produtividade do país<sup>8-10</sup>.

Desta forma, a utilização de anti-hipertensivos não visa apenas a diminuição dos níveis pressóricos, mas sobretudo promovem a prevenção de complicações cardiovasculares, que podem ser fatais ou não, reduzindo assim a taxa de mortalidade. Neste sentido, a farmacoterapia para HAS pode incluir o uso de um único medicamento anti-hipertensivo, bem como, a associação de várias classes. A monoterapia é apontada como primeira estratégia para o controle dos níveis pressóricos, bem como é indicada para pacientes que estão no estágio da doença com baixo risco de complicações cardiovasculares. Apesar disso, a maioria dos pacientes requerem o uso de uma associação de fármacos, uma vez que apresentam-se em estágios com um maior risco de desenvolvimento de DCV<sup>1,11,12</sup>.

Os fármacos para HAS são diversos e são classificados de acordo com seu mecanismo de ação em:

## INIBIDORES ADRENÉRGICOS (SIMPATOLÍTICOS)

Os medicamentos dessa classe são divididos de acordo com o local de atuação, em simpatolíticos de ação central e periférica. Além disso, são classicamente conhecidos como redutores dos níveis pressóricos por reduzirem o efluxo simpático para o sistema vascular e cardíaco <sup>(13)</sup>.

### SIMPATOLÍTICOS DE AÇÃO CENTRAL

São agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos e portanto atuam na estimulação de receptores  $\alpha_2$ adrenérgicos pré-sinápticos no sistema nervoso central, diminuindo assim a atividade simpática e o reflexo de barorreceptores, o que propicia a diminuição do débito cardíaco, dos níveis de renina na corrente sanguínea e da retenção de líquidos. Os fármacos anti-hipertensivos que fazem parte desse grupo são: Metildopa, Clonidina, Guanabenz e os inibidores dos receptores imidazolínicos, tais como a Moxonidina e a Rilmenidina<sup>1,13</sup>.

Esses agentes são muito utilizados, entretanto apresentam uma maior eficácia quando associados com outras medicações anti-hipertensivas. Além disso, vale ressaltar que esses promovem diversos efeitos colaterais, como sedação, sono excessivo, boca seca, cefaleia, tonturas e impotência sexual <sup>(13)</sup>.

### SIMPATOLÍTICOS DE AÇÃO PERIFÉRICA

Esses agentes atuam no sistema nervoso periférico e são classificados em alfa e beta bloqueadores<sup>(13)</sup>. O primeiro grupo é um bloqueador seletivo de  $\alpha_1$ -receptores pós-sinápticos, promovendo assim a redução da pressão arterial através da diminuição da resistência vascular periférica, que propicia o desenvolvimento de vasodilatação<sup>(1)</sup>.

Os agentes betabloqueadores são indicados para hipertensos que apresentam concomitantemente outras patologias como insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e cardiomiopatia obstrutiva. Além disso, é um tratamento adequado para hipertensos em estágios I e II e com palpitações, taquicardia, ansiedade e enxaqueca. Esses possuem diversos mecanismos de ação e atuam no controle da pressão arterial através da inibição do sistema nervoso, redução do débito cardíaco, redução dos níveis plasmáticos de renina e da diminuição da resistência vascular

periférica, que é ocasionada pelo aumento da liberação de óxido nítrico. Entre essa classe de fármacos estão as seguintes medicações: Acebutolol, Atenolol, Carvedilol, Labetalol, Metoprolol, Propranolol e Timolol<sup>14, 15</sup>.

### BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CÁLCIO

Esses agentes atuam através do bloqueio dos canais de cálcio na membrana celular, promovendo assim a diminuição da quantidade de cálcio no interior das células musculares lisas e das arteríolas, o que propicia a diminuição da resistência vascular periférica (vasodilatação periférica). Essa classe de fármacos é dividida em três grupos: fenilalquilaminas, benzotiazepinas e diidropiridinas, no entanto a diidropiridina é a classe mais utilizada e seus representantes são a Nifedipina e Amlodipina<sup>11,16,17</sup>.

### INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

Atuam através da inibição da ação da atividade da enzima conversora de angiotensina, impedindo assim a conversão da angiotensina I em angiotensina II. Esses agentes controlam não somente a pressão arterial, mas oferecem proteção miocárdica, renal e cerebral, e ainda possuem a vantagem de apresentarem poucos efeitos colaterais, no qual o principal é a presença de uma tosse seca, que pode propiciar a troca do medicamento<sup>(11)</sup>.

### ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1 DA ANGIOTENSINA II

Esses fármacos bloqueiam os receptores AT1 da angiotensina II, impedindo assim sua ação. Por inibirem a atividade da angiotensina sem ocasionar o aumento de bradicinina, propiciam a diminuição da presença de tosse como efeito colateral. Além disso, vale salientar que esses são utilizados em pacientes com diabetes tipo II e nefropatia diabética, uma vez que exercem proteção cardíaca e renal<sup>(18)</sup>.

### VASODILATADORES

Agem no músculo liso arterial promovendo a redução da resistência vascular periférica, com conseqüente relaxamento da musculatura vascular e vasodilatação. Os dois principais representantes dessa classe são o Hidralazina e Minoxidil<sup>(1)</sup>.

## DIURÉTICOS

Esses agentes controlam a pressão arterial por meio da diminuição do volume plasmático e da resistência vascular periférica. Além disso, são considerados ideias para o tratamento anti-hipertensivo em negros, obesos e idosos<sup>(18)</sup>. Os efeitos adversos dessa classe aparecem principalmente no início do tratamento e podem desaparecer com a continuidade da terapêutica. Desta forma, os efeitos mais frequentemente observados são intolerância à glicose, aumento dos níveis de cálcio e triglicérides, e diminuição dos níveis de sódio e magnésio. Além disso, diversos fatores são favoráveis a sua escolha, como baixo custo do tratamento e redução da morbimortalidade da HAS<sup>(18)</sup>. Esses fármacos se dividem em três classificações: tiazídicos, de alça e poupadores de potássio<sup>(19)</sup>.

## DIURETICOSTIAZÍDICOS

São considerados os diuréticos mais frequentemente utilizados, tanto em monoterapia quanto em associação com outras classes de anti-hipertensivos. Além disso, controlam a pressão arterial através da atuação no túbulo distal, promovendo uma natriurese moderada. A hidroclorotiazida é um dos seus representantes, sendo comumente utilizada na prática clínica<sup>(20)</sup>.

## DIURÉTICOS DE ALÇA

Esses fármacos atuam no bloqueio do transporte de sódio, potássio e cloro no segmento ascendente espesso da alça de Henle, aumentando assim a excreção urinária desses eletrólitos, e de outros concomitantemente, como cálcio e magnésio. Assim, devido a diminuição da concentração de solutos no interstício medular, ocorre a redução na reabsorção de água no túbulo coletor, com consequente regulação da pressão arterial. Entre os fármacos que constituem essa classe estão a Furosamida e Bumetamida<sup>8,11</sup>.

## DIURÉTICOS POUPADORES DE POTÁSSIO

Essa classe de fármacos é dividida de acordo com seu mecanismo de ação em antagonistas da aldosterona e inibidores de canais de sódio renais. O primeiro grupo possui como mecanismo de ação a competição com os receptores de aldosterona no túbulo coletor, e o segundo grupo bloqueia diretamente a reabsorção

de sódio nesse mesmo segmento tubular, uma vez que inibe diretamente os canais de sódio. Assim, por atuarem bloqueando direta ou indiretamente a atividade da aldosterona, esses agentes propiciam a redução da excreção de potássio pelo túbulo coletor, e por isso são conhecidos como diuréticos poupadores de potássio. Entre os representantes dessa classe na prática clínica estão o Triantereno e Amilorida<sup>8,21</sup>.

## INIBIDORES DIRETOS DA RENINA

Esses fármacos atuam diretamente na redução da produção de angiotensina II, e por isso inibem a atividade da renina. Vale ressaltar que esses não devem ser utilizados por gestantes, uma vez que apresentam como efeitos adversos tosse e diarreia. Entre seus representantes está o Alisquireno<sup>(11)</sup>.

Assim, diante dos inúmeros anti-hipertensivos existentes, torna-se necessário investigar quais as classes mais prevalentes na prática clínica para o controle da HAS. Além disso, compreender as interações que podem ocorrer entre fármacos, suas possíveis reações adversas, bem como, promover maior adesão ao tratamento por parte do paciente e ainda, estimular o uso racional de medicamentos, torna-se parte fundamental da atuação do profissional farmacêutico. Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo avaliar os aspectos farmacológicos da terapia utilizada no controle pressórico de pacientes hipertensos, em tratamento no Serviço de Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (SC-HC-UFG).

## METODOLOGIA

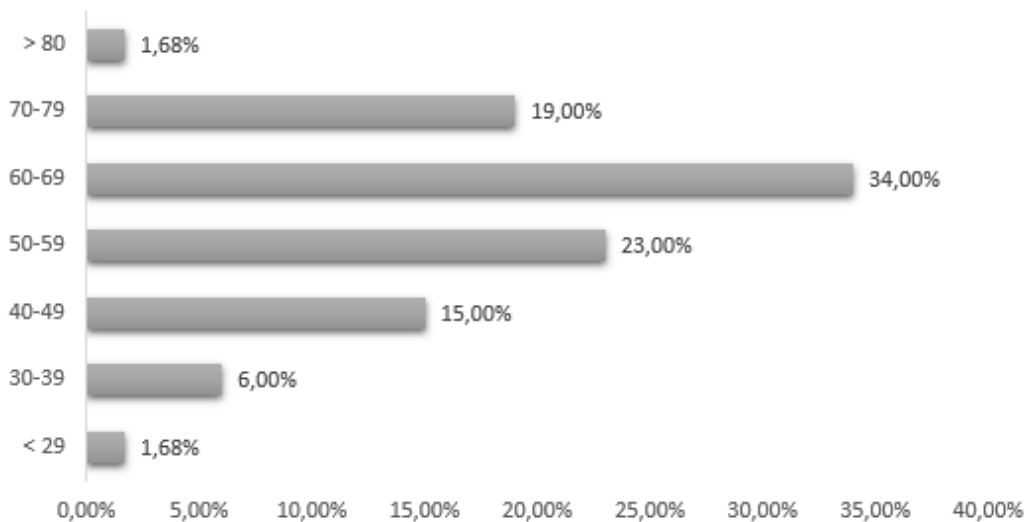
Trata-se de um estudo transversal de base hospitalar realizado entre os anos de 2014 e 2017. Esse foi conduzido através da análise de 113 prontuários de pacientes hipertensos sob tratamento no Serviço de Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO, Brasil. Os pacientes foram classificados em quatro grupos de estudo: pré-hipertensos, hipertensos em estágio I, hipertensos em estágio II e hipertensos em estágio III; os quais tiveram avaliados os aspectos farmacológicos referentes à HAS, com ênfase na elucidação

dos principais medicamentos indicados para seu controle. Os dados foram analisados com o *Software Microsoft Excel 2016*, e posteriormente foram confrontados com a literatura.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 195/11) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Pesquisa Médica Envolvendo os Seres Humanos da Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinque.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população estudada foi constituída de 113 indivíduos, 33 homens (29%) e 80 mulheres (71%) e apresentou idade média de 55,6 anos. Além disso, foi possível observar uma maior prevalência de indivíduos com idade entre os 60 e 69 anos, o equivalente a 34% do total dos pacientes, e que idosos acima dos 60 anos representaram 54,68% do tamanho amostral (Figura 1).



**Figura 1** – Distribuição dos indivíduos hipertensos (n=113) sob tratamento no Serviço de Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO, Brasil, percentual por idade.

Corroborando com nossos achados, Eid *et al.* (2013)<sup>22</sup> também observaram uma maior prevalência de idosos e mulheres em seu estudo. Esses resultados podem ser justificados pela maior quantidade de mulheres na população, sobretudo na terceira idade. Em relação a faixa etária predominante, ainda é importante mencionar que o envelhecimento propicia o surgimento de alterações morfológicas (enrijecimento de artérias), metabólicas e psíquicas no organismo e por isso a população idosa está mais propensa ao desenvolvimento da HAS. Assim, a HAS é considerada a principal doença crônica desse grupo populacional e estimativas indicam que no Brasil mais de 60% dos idosos são hipertensos<sup>23,24</sup>.

Concernente aos níveis pressóricos, os pacientes foram classificados de acordo com a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão<sup>(1)</sup> em pré-hipertensos (15%), hipertensos em estágio I (37%), hipertensos em estágio II (25%) e hipertensos estágio III (23%) (Tabela 1). Além disso, quando questionados sobre complicações relacionadas às doenças cardiovasculares, 55% dos pacientes relataram episódios prévios de arritmia ou AVC.

**Tabela 1** – Distribuição percentual dos pacientes de acordo com os níveis pressóricos.

<b>Classificação</b>	<b>N</b>	<b>Percentual</b>
Pré-hipertensos	17	15%
Hipertensão I	42	37%
Hipertensão II	28	25%
Hipertensão III	26	23%

Os resultados demonstraram uma maior prevalência de indivíduos hipertensos em estágio I, assim como um estudo realizado com indivíduos hipertensos atendidos no Ambulatório de Cardiologia do Hospital de Urgências de Goiânia, HUGO<sup>(25)</sup>. Por outro lado, houve uma menor prevalência de indivíduos pré-hipertensos e apesar disso, é importante ressaltar que a pré-hipertensão é caracterizada por níveis da pressão arterial sistólica entre 121 e 139 mmHg e/ou da diastólica entre 81 e 89 mmHg, e assim, indivíduos que se encontram nessa classificação necessitam de acompanhamento médico periódico, uma vez que

possuem uma maior propensão de se tornarem hipertensos e de sofrerem complicações cardiovasculares, do que os indivíduos normotensos ( $\leq 120/80$  mmHg)<sup>(1)</sup>.

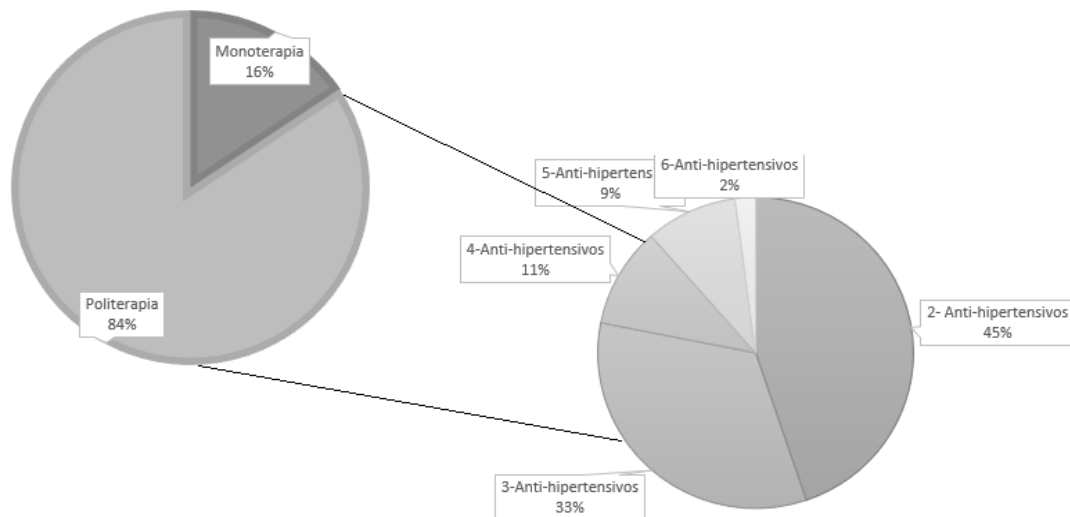
Ademais, é importante mencionar que os eventos cardiovasculares foram frequentes em nossa pesquisa, assim como no estudo de Mozaffarian et al. (2015)<sup>26</sup>, em que foi observado que 69% dos indivíduos que apresentaram o primeiro episódio de IAM e 77% dos indivíduos que sofreram acidente vascular encefálico, apresentavam a hipertensão arterial sistêmica como fator predisponente.

Quanto ao tratamento terapêutico, 15% (n= 17) dos pacientes relataram dificuldades na adesão à farmacoterapia prescrita, 16% (n=18) utilizavam apenas um único medicamento para o controle da HAS e 84% (n=95) estavam sob politerapia, na qual um mesmo paciente poderia estar sob a terapêutica de 2 a 6 comprimidos anti-hipertensivos. Desta forma, os resultados demonstraram que 45% (n= 51) dos pacientes faziam o uso de 2 anti-hipertensivos, 33% (n=37) utilizam 3 fármacos para o controle da HAS, 11% (n=12) faziam o tratamento com 4 medicamentos, e 9% (n=10) e 2% (n=3) eram usuários de 5 e 6 fármacos, respectivamente (Figura 2).

Apesar da grande maioria da população estudada fazer o uso dos medicamentos anti-hipertensivos, uma parcela considerável ainda apresentou dificuldades à adesão terapêutica. Esse é o principal fator predisponente para o não controle da HAS, propiciando nesses pacientes um risco três vezes superior de síndrome coronária aguda do que em pacientes sob terapia anti-hipertensiva<sup>1,27</sup>. Em relação ao número de medicações, um estudo de corte transversal<sup>(28)</sup> realizado na região Sul do Brasil demonstrou que apenas uma pequena parcela dos hipertensos (16,59%) utilizavam mais de dois medicamentos, o que não foi constatado em nosso estudo, já que 84% dos pacientes utilizavam dois ou mais medicamentos para o controle da HAS.

Essa diferença entre os dois estudos pode ser justificada pelo período de diagnóstico da doença, visto que o estudo de Barreto *et al.* (2015)<sup>28</sup> apresentou como característica predominante indivíduos com pouco de tempo de diagnóstico,

o que não foi observado no presente trabalho, uma vez que houve uma prevalência de pacientes (n=70; 61,9%) com um maior período de diagnóstico,  $\geq 10$  anos.



**Figura 2** – Distribuição do esquema terapêutico anti-hipertensivo para os 113 pacientes hipertensos sob tratamento no Serviço de Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO, Brasil.

No que se refere a classe de medicamentos predominante, constatou-se que os diuréticos tiazídicos foram os mais prescritos (74%), tanto para os pacientes em monoterapia, quanto para os pacientes que o utilizavam em associações, seguidos dos fármacos de antagonistas dos receptores  $AT_1$  de angiotensina II (68%) e dos inibidores da ECA (43%) (Tabela 2).

Dentre os diuréticos tiazídicos houve uma maior prevalência da Hidroclorotiazida (47%), seguida pelo Clortalidona (27%) e Indapamida (1,8%). Concernente aos antagonistas dos receptores  $AT_1$  de angiotensina II houve uma maior prescrição de Losartana (65%), seguida por Telmisartan, Valsartana e Olmesartana. Os diuréticos de alça demonstraram menor regularidade, com maior destaque para Furosemida.

**Tabela 2** – Frequência de utilização das classes de anti-hipertensivos (diuréticos tiazídicos, antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> da angiotensina II, inibidores da ECA, bloqueadores dos canais de cálcio, betabloqueadores, agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos, diuréticos poupadores de potássio e diuréticos de alça) pelos pacientes do estudo.

Classe	Frequência
Diuréticos tiazídicos	74%
Antagonistas dos receptores AT <sub>1</sub> da angiotensina II	68%
Inibidores da ECA	43%
Bloqueadores dos canais de cálcio	37%
Betabloqueadores	34%
Agonistas $\alpha_2$ -adrenérgicos	9,7%
Diuréticos poupadores de potássio	3,5%
Diuréticos de alça	2,6%

A preferência na prescrição de diuréticos seguido de antagonistas de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II e, inibidores de conversão enzimática, parece ser um padrão entre a maioria dos cardiologistas brasileiros. O elevado número de prescrições de diuréticos tiazídicos é bastante concordante com outros estudos realizados no Brasil e mesmo em outros países<sup>29-31</sup>.

Por outro lado, os dados obtidos na literatura também corroboram com esse achado, uma vez que essa classe é utilizada há anos como primeira opção no tratamento da hipertensão arterial. Assim, as evidências indicam que esse apresenta uma excelente ação em monoterapia, mas principalmente quando em associação com outros fármacos que apresentam diferentes mecanismos de ação<sup>29-32</sup>. Além de sua eficácia terapêutica, o fato de seus efeitos adversos serem bem tolerados e não menos importante, seu baixo custo, podem ser considerados como os principais fatores que possivelmente justifiquem sua taxa de prescrições<sup>(33)</sup>.

A indicação de antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II e inibidores da ECA pode estar diretamente relacionada à sua eficácia terapêutica, uma vez que esses atuam tanto na redução da pressão arterial, quanto na morbimortalidade cardiovascular. A sobressaída da prescrição da primeira classe em relação à segunda pode ser explicada pela tolerabilidade dos efeitos

indesejáveis, no qual é bem conhecido que os antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II são melhores aceitos que inibidores da ECA, visto que essa classe apresenta maiores efeitos colaterais, como tosse seca, mudança no paladar, e em alguns casos erupção cutânea e edema angineurótico<sup>(34)</sup>.

O baixo índice de prescrições de diuréticos de alça pode estar relacionado aos seus desagradáveis efeitos adversos, pois apesar de demonstrarem grande eficácia na redução da pressão arterial, apresentam efeitos colaterais distintos como ototoxicidade, hipovolemia, perda renal de íons como potássio, sódio, magnésio e hidrogênio, hiperuricemia, aumento dos níveis de glicose, colesterol LDL e triglicérides, náuseas e nefrite intersticial alérgica<sup>(35)</sup>. Nesse sentido, também são relatadas ocorrências do aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, e logo após o início do seu uso, surge o aparecimento de câimbras musculares, que potencialmente estão relacionadas à adesão e a eficácia terapêutica<sup>(36)</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A HAS é uma doença crônica que ainda acomete grande parte da população mundial. Nesse sentido, o controle dos níveis pressóricos é fundamental e pode ser alcançado por meio de mudanças no estilo de vida e em última instância pela implementação de medidas farmacológicas.

Além de propiciar a diminuição dos níveis pressóricos, a utilização de anti-hipertensivos promove a prevenção de complicações cardiovasculares, que podem ser fatais ou não, reduzindo assim a taxa de mortalidade nos portadores da HAS. Desta forma, a farmacoterapia para a hipertensão pode incluir o uso de um único medicamento anti-hipertensivo, bem como, a associação de várias classes.

No presente estudo, a politerapia foi a medida terapêutica farmacológica mais prevalente, sendo os diuréticos tiazídicos mais frequentemente observados nas prescrições médicas, com um destaque para a hidroclorotiazida. A eficácia terapêutica dos diuréticos tiazídicos, seus efeitos adversos bem tolerados e seu

baixo custo, podem ser considerados como os principais fatores que possivelmente justifiquem sua taxa de prescrições.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), Brasil, pela disponibilidade dos dados e oportunidade para realização da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- (1) Malachias, M. V. B.; Souza, W. K. S. B.; Plavnik, F. L.; Rodrigues, C. I. S.; Brandão, A. A.; Neves, M. F. T.; et al. 2016. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. Arq. Bras. Cardiol. 107(3Supl.3):1-83.
- (2) Dias, E. G.; Souza, E. L. S.; Mishima, S. M. 2016. Influência da enfermagem na adesão do idoso ao tratamento da hipertensão. Rev. Eletrônica Gestão e Saúde.(3): 1156-72.
- (3) Akhtar, S.; Asghar, N. 2015. Risk factors of cardiovascular disease in district Swat. J. Pak. Med. Assoc. 65(9): 1001-4.
- (4) D'Andrea, E.; Nagyova, I.; Villari, P. 2015. Cardiovascular Disease (CVD). A Systematic Review of Key Issues in Public Health. 33–64. DOI: 10.1007/978-3-319-13620-2\_4.
- (5) Favero, G.; Paganelli, C.; Buffoli, B.; Rodella, L. F.; Rezzani, R. 2014. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. Biomed Res. Int.2014: 1-28. DOI: 10.1155/2014/801896.
- (6) Galvão, A. L. B.; Palazzo, E. L.; Pinto, M. L.; Vieira, M. C.2014. Importância da inflamação na hipertensão arterial: Revisão. Nucleus Animalium. 6(1): 47-58. DOI: 10.3738//1982.2278.1012.
- (7) Longo, M. A. T.; Martelli, A.; Zimmermann, A.2011. Hipertensão Arterial Sistêmica: aspectos clínicos e análise farmacológica no tratamento dos pacientes de

um setor de Psicogeriatrics do Instituto Bairral de Psiquiatria, no Município de Itapira, SP. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. 14 (2): 271-284.

(8) De Almeida, A. G.; Teles, C. D.; Silva, M.S.; De Toledo, M.; Rocha, R. B.; Gonçalves, I. C. L. 2017. Fatores associados à adesão ao tratamento farmacológico em idosos que utilizam medicamento anti-hipertensivo. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. 20 (1):116-127. DOI: 10.1590/1981-22562017020.160098.

(9) De Carvalho, M. V.; Siqueira, L. B.; Sousa, A. L.; Jardim, P. C. 2013. A influência da hipertensão arterial na qualidade de vida. Arq. Bras. Cardiol. 100(2): 164-174. DOI: 10.5935/abc.20130030.

(10) Soares, E. D. F. G.; Da Silva L. P.; Costa, A. A. S. 2017. Evidências da interrelação trabalho/ocupação e hipertensão arterial sistêmica: uma revisão integrativa. Rev. Bras. Promoç. Saúde. 30 (1):102-9. DOI: 10.5020/18061230.2017. p102.

(11) Jardim, P. C. B. V.; Jardim, T. S. V.; Souza, W. K. S. V. 2013. Como Diagnosticar e Tratar Hipertensão Arterial Sistêmica. Moreira Jr. 70(12): 64-75.

(12) VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão – DBH VI. 2010. Rev. Bras. Hipertens. 17(1):1-64.

(13) Plavnik, F. L.; Tavares, A. 2001. Hipertensão arterial. Rev. Bras. Med. 58: 113-6.

(14) Da Silva, P. C.; Dalmaz, C. A. 2013. Orientações na administração de medicamentos anti-hipertensivos em idosos. Cippus. 2(1): 139-150.

(15) Frishman, W. H. 2016. Beta-adrenergic receptor blockers in hypertension: alive and well. Prog. Cardiovasc. Dis. 59(3): 247-252. DOI: 10.1016/j.pcad.2016.10.005.

(16) Elliott, W. J.; Ram, C. V. S. 2011. Calcium channel blockers. J. Clin. Hypertens. 13(9): 687-689. DOI: 10.1111/j.1751-7176.2011.00513.x.

(17) Sindone, A.; Erlich, J.; Perkovic, V.; Suranyi, M.; Newman, H.; Lee, C.; et al. 2013. ACEIs for cardiovascular risk reduction: Have we taken our eye off the ball? Aust. Fam. Physician. 42(9): 634-38.

- (18) Nobre, F.; Coelho, E. B.; Lopes, P. C.; Geleilete, T. J. 2013. Hipertensão arterial sistêmica primária. Medicina (Ribeirao Preto). 46(3): 256-272.
- (19) Oigman, W.; Neves, M. F.; Gismondi, R. A. O. C. 2015. Hipertensão arterial sistêmica. RBM Rev. Bras. Med. 72(1/2): 5-17.
- (20) Moreira, G. C.; Cipullo, J. P.; Martin, J. F. V. 2013. Existem diferenças entre os diversos diuréticos? Rev. Bras. Hipertens. 20(2): 55-62.
- (21) Oliveira, P.A. R.; De Menezes, F. G. 2013. Atenção farmacêutica a pacientes hipertensos. Rev. Eletronica Farm. 10(1):51-68. DOI: 10.5216/ref.v10i1.20622.
- (22) Eid, L. P.; Nogueira, M. S.; Veiga, E. V.; Cesarino, E. J.; Alves, L. M. M. 2013. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo: análise pelo Teste de Morisky-Green. Rev. Eletrônica Enferm. 15(2): 362-7. DOI: 10.5216/ree.v15i2.15599.
- (23) Esperandio, E. M.; Espinosa, M. M.; Martins, M. S. A.; Guimarães, L. V.; de Lima Lopes, M. A.; Scala, L. C. N. 2013. Prevalência e fatores associados à hipertensão arterial em idosos de municípios da Amazônia Legal, MT. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. 16(3): 481-493. DOI: 10.1590/S1809-98232013000300007.
- (24) de Andrade, A. O.; de Aguiar, M. I. F.; de Almeida, P. C.; Chaves, E. S.; Araujo N. V. S. S.; de Freitas Neto, J. B. Prevalência da hipertensão arterial e fatores associados em idosos. 2015. Rev. Bras. Promoç. Saúde. 27(3): 303-311. DOI: 10.5020/18061230.2014. p 303.
- (25) Tacon, K. C. B.; Santos, H. C. O.; Castro, E. C. 2010. Perfil epidemiológico da hipertensão arterial sistêmica em pacientes atendidos em hospital público. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd. 8(6): 486-9.
- (26) Mozaffarian, D.; Benjamin, E. J.; Go, A. S.; Arnett, D. K.; Blaha, M. J.; Cushman, M.; et al. 2015. Executive summary: Heart disease and stroke statistics 2015: update a report from the American Heart Association. Circulation. 131(4): 434-441. DOI: 10.1161/CIR.000000000000157.
- (27) Grezzana, G. B.; Stein, A. T.; Pellanda, L. C. 2013. Adesão ao tratamento e controle da pressão arterial por meio da monitoração ambulatorial de 24 horas. Arq. Bras. Cardiol. 100(4): 355-61. DOI: 10.5935/abc.20130046.

- (28) Barreto, M. D. S.; Cremonese, I. Z.; Janeiro, V.; Matsuda, L. M.; Marcon, S. S. 2015. Prevalence of non-adherence to antihypertensive pharmacotherapy and associated factors. Rev. Bras. Enferm. 68(1): 60-67. DOI: 10.1590/0034-7167.2015680109p.
- (29) Reinhardt, F.; Ziulkoski, A. L.; Andrighetti, L. H.; Perassolo, M. S. 2012. Acompanhamento farmacoterapêutico em idosos hipertensos residentes em um lar geriátrico, localizado na Região Vale dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. 15(1):109-117.
- (30) Albuquerque, D. C. D.; Souza Neto, J. D. D.; Bacal, F.; Rohde, L. E. P.; Bernardez-Pereira, S.; Berwanger, O. 2015. I Brazilian registry of heart failure-clinical aspects, care quality and hospitalization outcomes. Arq. Bras. Cardiol. DOI: 10.5935/abc.20150031.
- (31) Mario, A.; Ferreira, R. C. 2015. Control of Hypertension in Elderly Patients Receiving Primary Care in Portugal: A Cross-sectional Study in 2013. J. Am. Soc. Hypertens. 9(4): e67. DOI: 10.1016/j.jash.2015.03.154.
- (32) Batlouni, M. 2009. Diuréticos. Rev. Bras. Hipertens. 16(4):211-4.
- (33) Pimenta, E. 2008. Hidroclorotiazida x clortalidona: os diuréticos tiazídicos são todos iguais? Rev. Bras. Hipertens. 15(3):166-7.
- (34) Kohlmann, Jr. O.; Gus, M.; Ribeiro, A. B.; Vianna, D.; Coelho, E. B.; Barbosa, E.; et al. 2010. Tratamento medicamentoso. J. Bras. Nefrol. 32 (Supl1): 29-43. DOI: 10.1590/S0101-28002010000500008.
- (35) Roush, G. C.; Kaur, R.; Ernst, M. E. 2014. Diuretics: a review and update. J. Cardiovas. Pharmacol. Ther. 19(1): 5-13. DOI: 10.1177/1074248413497257.
- (36) Garrison, S. R.; Dormuth, C. R.; Morrow, R. L.; Carney, G. A.; Khan, K. M. 2012. Nocturnal leg cramps and prescription use that precedes them: a sequence symmetry analysis. Arch. Intern. Med. 172(2): 120-126. DOI: 10.1001/archinternmed.2011.1029.



[www.crbio04.gov.br](http://www.crbio04.gov.br)  
[actabiologica@crbio04.gov.br](mailto:actabiologica@crbio04.gov.br)