

'Parasita do bem' pode ser letal em casos de malária, revela estudo do IB

Responsável por 85% dos registros, *Plasmodium vivax* era até então associado apenas a ocorrências benignas

JEVERSON BARBIERI
jeverson@unicamp.br

Após quatro anos de pesquisa em campo e em laboratório, o professor Fábio Trindade Maranhão Costa, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, e suas orientandas de doutorado, Bruna O. Carvalho e Stefanie C. P. Lopes, chegaram a conclusões inéditas sobre a atuação do *Plasmodium vivax* – espécie de parasita causador da malária – em células endoteliais humanas pulmonares, cerebrais e cortes histológicos de placentas humanas. Responsável por quase 85% dos casos de malária no Brasil, o *P. vivax*, que antes era associado às ocorrências benignas da doença, chamou a atenção do pesquisador por conta de relatórios recentes que confirmaram patologias graves em pacientes infectados com o parasita. Após coletar amostras de sangue de mais de 100 pacientes infectados, foi possível observar que – ao contrário do que se imaginava –, há uma adesão da hemácia infectada pelo *P. vivax* ao endotélio celular. “Nas infecções por *P. falciparum*, dependendo de onde ocorre, essa adesão, além de outros fatores, pode levar o paciente à morte. Se é no pulmão, causa a síndrome respiratória aguda; se é no cérebro, causa a malária cerebral, e na placenta, fato bastante comum em áreas de risco, temos a malária gestacional”, esclareceu Costa. Para ele, o resultado desse trabalho irá mudar o paradigma estabelecido, uma vez que a citoadesão em *vivax* nunca havia sido considerada e, seguramente, fará com que a patogênese seja estudada por uma ótica diferente.

O processo de adesão de hemácias infectadas em células endoteliais não é novidade no caso da malária. Outra espécie prevalente no Brasil, a *P. falciparum*, é bastante estudada por uma série de razões, entre as quais a da facilidade do cultivo do parasita em laboratório. “É isso acontece desde a década de 1970”, contou Costa. O *falciparum* tem uma característica que é a capacidade adesiva, ou seja, uma vez dentro das hemácias, exporta seus antígenos para a superfície das hemácias infectadas e por meio de estruturas eletrodensas (Knobs) apresenta uma capacidade adesiva, uma espécie de cola. Dessa maneira, consegue se aderir no endotélio de veias e microcapilares. Sendo assim, desaparece da corrente sanguínea periférica, em processo denominado “sequestro”. O processo de adesão do parasita está diretamente relacionado com a sua virulência severa, sendo que em torno de 1% dos casos apresenta fatalidade, o que significa de 1 milhão a 2 milhões de mortes anualmente.

No caso do *vivax*, a dificuldade inicial está na impossibilidade de cultivo em laboratório, o que não permite a obtenção de grandes quantidades do parasita. Consequentemente, ele é pouco estudado. Além disso, assim como o *falciparum*, o *vivax* começa a dar sinais de quimiorresistência, principalmente com a cloroquina, que é a droga comumente usada contra essa espécie. Alguns casos graves ou complicações com hospitalização fo-

ram registrados em países como Índia, Quênia, Turquia, Afeganistão, Malásia, Colômbia, Cingapura e Brasil.

Costa revela que essa pesquisa teve início em 1998, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Nacional de Tecnologias de Vacinas (INTV). Quando começou, o pesquisador tinha como objetivo verificar se o *vivax* tinha alguma capacidade adesiva, apesar desta espécie de parasita não ter Knobs na sua superfície e não sequestrar. Em um paciente infectado com *P. falciparum*, dificilmente se encontra a forma madura do parasita na hemácia (também chamada de hemácia madura), porque ela está aderida e, portanto, não é possível encontrá-la na amostra de sangue retirada do paciente. “Isso é o sequestro”, reforçou Costa.

Já para uma amostra de um paciente infectado com o *vivax* é possível observar a forma madura da hemácia, portanto, deduz-se que não há adesão. Dessa maneira tornou-se consenso científico, segundo o docente, de que esse parasita não adere. “Nunca ninguém havia feito ensaio sobre isso e, a partir do aumento do número de casos no Brasil de complicações por essa espécie de parasita, fiquei imaginando o que poderia estar acontecendo”, comentou. Juntamente com o médico Marcos Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, e do pesquisador Paulo Nogueira, da Fundação Oswaldo Cruz, também do Amazonas, conseguiu que a pesquisa tivesse continuidade. “Sem a participação desses dois especialistas seria impossível a realização do trabalho. Foi de lá que vieram as amostras de sangue e parte das análises”, ressaltou.

Metodologia

Após a certificação de que o sangue está infectado apenas por uma espécie de malária, é necessário enriquecer essa amostra com Percoll, uma espécie de gelatina capaz de elevar o pequeno índice de hemácias infectadas a praticamente 100%. Esse protocolo, de acordo com Costa, não estava disponível e foram necessários seis meses de trabalho para o seu pleno desenvolvimento. Como não há possibilidade de manter o *vivax* em laboratório, foi feito o enriquecimento logo após a coleta para, em seguida, testar a sua capacidade adesiva, ex-vivo, em células endoteliais de pulmão, cérebro e placenta. O pesquisador e

suas orientandas iniciaram então os estudos para entender de que maneira ele adere. “Não sabíamos se era via algum receptor endotelial específico e/ou são antígenos proteicos que estão na superfície dessa hemácia infectada que faz essa adesão”, revelou Costa.

“Começamos a desvendar como essa hemácia infectada adere”, revelou o docente. Algumas estratégias foram colocadas em prática. Por exemplo, um dos possíveis receptores estudados foi o sulfato de condroitina A (CSA), um glicosaminoglicano que está na matriz extracelular e que está diretamente associado à malária gestacional e suas complicações nas infecções por *P. falciparum*. Outros possíveis receptores estudados foram o CD36 e o ICAM-1, envolvidos na malária cerebral da espécie *falciparum*, por exemplo. Para desvendar o envolvimento destes receptores na adesão por *P. vivax*, os pesquisadores utilizaram CSA solúvel (que por competição bloqueia o receptor CSA), anticorpos capazes de bloquear o receptor CD36.

Ainda, para avaliar se antígenos proteicos na superfície das hemácias infectadas por *P. vivax* estariam envolvidas na adesão, os pesquisadores trataram essas células infectadas com tripsina. De fato, a tripsinização aboliu quase completamente a adesão de *vivax*, mostrando a participação de proteínas da superfície do parasita na adesão desta espécie. Ainda, a adição de CSA solúvel foi capaz de inibir significativamente a adesão, enquanto que anticorpos anti-CD36 não alteraram a taxa interação. Isso mostra o envolvimento do CSA, porém não do CD36, na aderência deste parasita.

Costa ponderou ainda que os ensaios realizados até aquele momento eram apenas estáticos e que, comparativamente, o *P. falciparum* coletado de pacientes infectados foi capaz de aderir 10 vezes mais que o *P. vivax*. No corpo humano existe um fluxo sanguíneo, uma pressão, e o questionamento feito pelo docente baseou-se na relevância da adesão estática. O docente queria saber se essa adesão tinha uma força suficiente que fosse significativa para manter a hemácia infectada aderida frente a pressão sanguínea. Estabeleceu, então, um modelo usado na França que consiste em um sistema de fluxo. Tem um microscópio invertido, uma câmara de fluxo com uma entrada e uma saída e a bomba peristáltica. A partir da pressão exercida, os pesquisadores observaram qual a capacidade dessas hemácias infectadas por *vivax* de aguentar essa



Stefanie Lopes, orientanda, durante pesquisa realizada em Manaus

pressão, semelhante à do corpo humano. No momento zero conta-se o número de hemácias infectadas e a cada aumento da pressão vai-se contando o número de hemácias que permanecem aderidas. “O que se vê é que existe uma proporção aderida, ou seja, é uma adesão real, pelo menos ex-vivo”, afirmou.

Para o docente é importante notar que em um fluxo pequeno, *falciparum* assim como *vivax* permanecem com 90% de aderência. Quando essa pressão é bastante aumentada, o *falciparum* contabiliza uma aderência de 50%, número muito próximo do *vivax*. Isso significa que, apesar de ter uma quantidade de hemácias infectadas aderidas dez vezes menor que *P. falciparum*, o *vivax* possui uma força de interação similar à do *P. falciparum*.

Após essa fase, os pesquisadores modularam o endotélio pulmonar com lipopolissacarídeo (LPS), mimetizando o processo inflamatório. Quando o LPS é injetado, ele aumenta a expressão de uma molécula, denominada ICAM-1, que está envolvida no processo de adesão de células imunocompetentes, e relacionada com a inflamação. “Vimos que existe um aumento significativo de ICAM-1, o que era esperado. No entanto, quando o parasita é colocado, é possível perceber uma melhor adesão nessas células que foram estimuladas em comparação às não estimuladas, ou seja, isso sugere possivelmente que um processo inflamatório pode modular positivamente a adesão do parasita”, avaliou.

Parceiro de pesquisa de Costa, o professor Hernando del Portillo, atualmente no Barcelona Center for International Health Research, publicou na revista *Nature*, quando ainda era docente da Universidade de São Paulo (USP), que o *vivax* tem uma família gênica chamada *vir*, que significa genes variáveis. Uma vez que *falciparum* tem genes variáveis e as proteínas que

são codificadas por eles têm capacidade adesiva, Portillo relatou que o *vivax* tem algo semelhante. “Ele e a professora Irene Soares, da USP, clonaram, expressaram antígenos VIR e geraram anticorpos anti-VIR”, disse Costa. Esses anticorpos reconhecem a superfície do parasita. Então, os pesquisadores da Unicamp incubaram a hemácia infectada, o anticorpo e a célula endotelial. “Se existe alguma relação, não irá haver aderência”, afirmou. O resultado foi de quase 60% de inibição, porém, para Costa isso demonstra muito pouco porque o processo é complexo. No entanto, indica, de alguma maneira, que os antígenos VIR estão envolvidos na adesão.

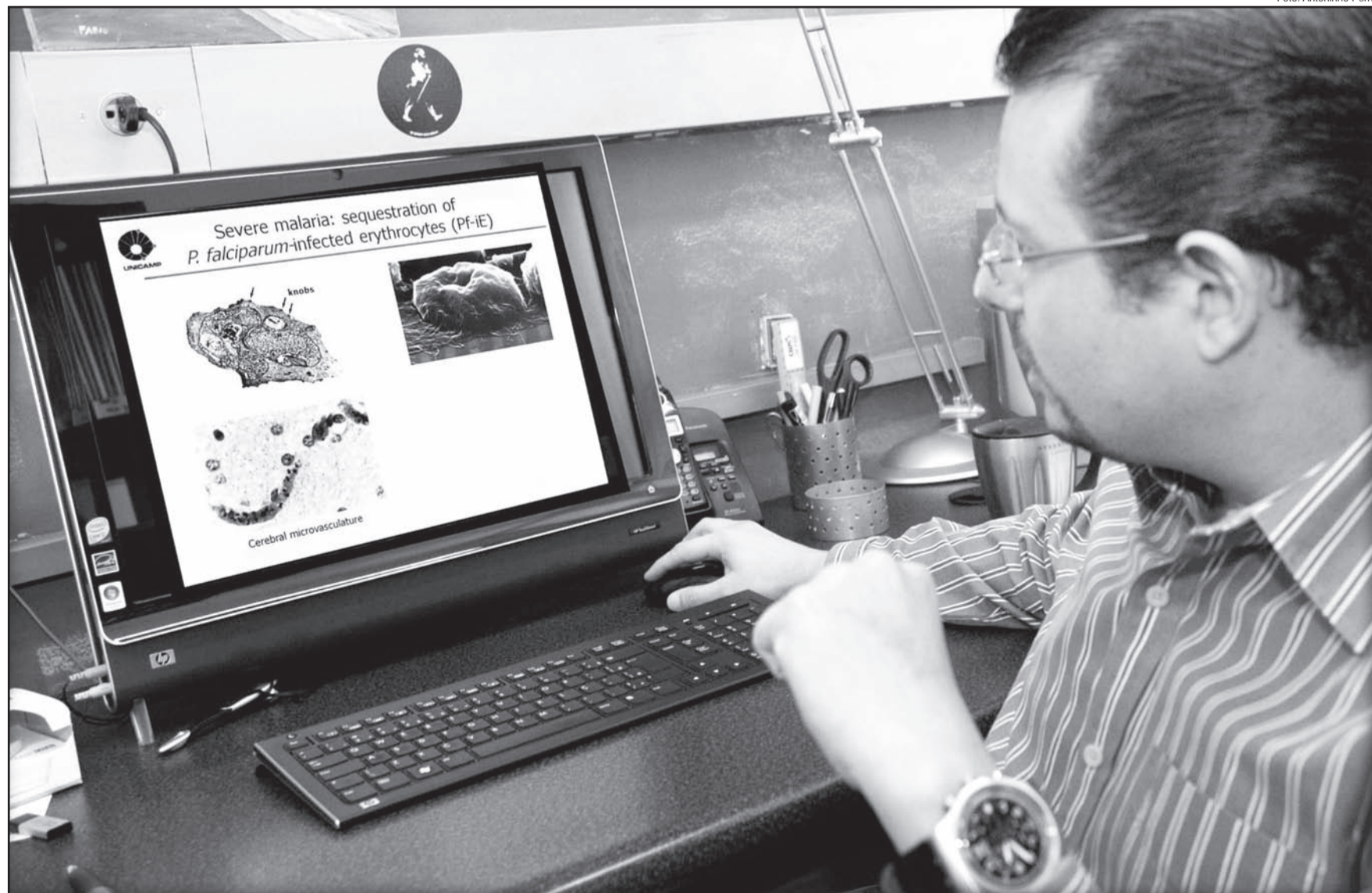
No Exterior

O trabalho completo foi aceito na revista *The Journal of Infectious Diseases*, importante revista da área. O resumo submetido pela doutoranda Stefanie Lopes também foi aceito para apresentação oral no XII Congresso Internacional de Parasitologia, que acontece em Melbourne (Austrália) neste mês de agosto. Aproveitando sua ida a esse evento, Costa segue para Cingapura, onde profere palestra a respeito do tema. Ele foi convidado pelo professor Laurent Renia, co-autor do trabalho, com quem Costa mantém uma cooperação muito forte. A palestra será realizada no Singapore Immunology Network (SigN).

Artigo

On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes, Carvalho, B.O.; Lopes, S.C.; Nogueira, P.A.; Orlandi, P.P.; Bargieri, D.Y.; Blanco, Y.C.; Mamoni, R.; Leite, J.A.; Rodrigues, M.M.; Soares, I.S.; Oliveira, T.R.; Wunderlich, G.; Lacerda, M.V.; Del Portillo, H.A.; Araújo, M.O.; Russel, B.; Suwanarusk, R.; Snounou, G.; Rémia, L. And Costa, F.T., *The Journal of Infectious Diseases*, 2010;202(4):638-647.

Foto: Antoninho Perri



O professor Fábio Trindade Maranhão Costa, coordenador das pesquisas: novo olhar sobre a patogênese da doença