

INTERAÇÃO *Plasmodium/Anopheles*: UM MISTÉRIO POR RESOLVER?

ANA CUSTÓDIO (Custódio A.) * / **

HENRIQUE SILVEIRA (Silveira H.) * / **

ANTÓNIO PAULO GOUVEIA DE ALMEIDA (Almeida A.P.G.) * / ***

* Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa. Rua da Junqueira, 100, 1349-008 Lisboa, Portugal. Tel. : 213652600. E-mail: PAlmeida@ihmt.unl.pt (Almeida APG).

** Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais (CMDT) / IHMT.

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

As interações entre o vetor e o parasita são essenciais para que se complete o ciclo de vida do parasita causador da malária. A transmissão de *Plasmodium* a um novo hospedeiro vertebrado obriga a que este se desenvolva dentro do hospedeiro invertebrado. Esta obrigatoriedade poderá ser um calcanhar de Aquiles, mas, será que a especificidade destas interações poderá ser utilizada como ferramenta de controlo desta doença? Esta revisão, embora não apresentando a solução para o problema, realça as barreiras físicas e moleculares ao plasmódio dentro do seu hospedeiro invertebrado, demonstrando o potencial deste tema no controlo da doença.

Quando a fêmea do mosquito *Anopheles* faz a sua refeição sanguínea (RS) num indivíduo infetado e portador de gametócitos de plasmódio, inicia-se a fase esporogónica do ciclo de vida deste parasita, cuja duração média é 12 dias, dependendo da temperatura ambiente e das espécies de parasita e vetor envolvidos. Após a fusão dos gametas, é originado um zigoto que evolui para oocineto que, em 12-24h, invade o epitélio do intestino médio do mosquito.

Dentro do mosquito, o plasmódio é extracelular nos estados que vão desde o gametócito até à invasão do esporozoíto, nas glândulas salivares (GS), estando exposto à resposta imunitária quer do hospedeiro vertebrado, transportada na refeição sanguínea

infetante ou noutras posteriores que o vetor faça, quer à própria resposta imunitária do mosquito. Esta ação do sistema imunitário do hospedeiro vertebrado tem sido explorada na pesquisa de candidatos para vacinas de bloqueio de transmissão, ou vacinas altruístas, tendo já sido identificadas moléculas candidatas, como Pfs48/45 e P25-P28, cuja função se pensa estar relacionada com a formação de nanotúbulos que facilitam o contacto intercelular na fecundação (Chowdhury *et al.*, 2009).

Quando atinge a lâmina basal, o oocineto tem que enfrentar várias barreiras, a primeira das quais é a matriz peritrófica (MP), seguida do epitélio intestinal. A MP é uma camada acelular constituída por glicoproteínas, que se forma ao redor da RS e cuja função é proteger o epitélio contra os cristais de hematina, bactérias, e obstrução das microvilosidades, delimitando também um espaço endo- e ecto-peritrófico. A MP tem sido relacionada com a competência vetora de diferentes espécies de mosquitos *Anopheles* para várias espécies de plasmódios, sem que haja evidência conclusiva, podendo esta constituir uma barreira absoluta em mosquitos refratários ou apenas uma barreira limitante da velocidade de penetração. Alguns estudos permitiram, no entanto, comprovar o papel da MP de *Aedes aegypti* no processo de invasão pelos oocinetos de *P. gallinaceum* (Shahabuddin *et al.*, 1996).

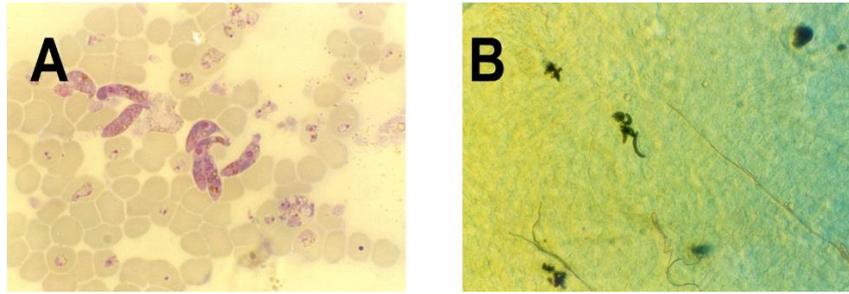


Fig. 7 – Oocinetos de *Plasmodium berghei*: A) em cultura, com coloração Giemsa e sob microscópio ótico Zeiss (ampliação: 1000X); B) melanizados no intestino médio de *Anopheles stephensi*, em preparação a fresco, sob microscópio ótico Zeiss (ampliação: 400X) (Fotos de Almeida, APG).

A rota de invasão do epitélio intestinal é diferente consoante a espécie de mosquito e parasita, podendo ser utilizada via intracelular, intercelular ou ambas. A teoria da “bomba-relógio” veio esclarecer este ponto, durante muito tempo alvo de controvérsia (Han *et al.*, 2000). Vários têm sido os alvos estudados com vista a interromper a cadeia de transmissão nesta fase. Destacam-se alguns trabalhos realizados no nosso instituto, como o silenciamento do citocromo P450 redutase e das tubulinas A e B, cujo efeito se traduziu numa redução da penetração de oocinetos de *P. berghei* no epitélio de *An. gambiae* (Félix e Silveira, 2011). Igualmente, foi pela primeira vez demonstrado que a injeção de oligonucleótidos contendo motivos CpG em mosquitos tornou-os menos suscetíveis à infeção pelo plasmódio, estando este efeito relacionado com a ativação da enzima transglutaminase (Silveira *et al.*, 2012).

A superfície microvilar do epitélio tem sido também explorada como alvo para a interrupção da transmissão. A imunização contra extratos das microvilosidades resultou em mortalidade aumentada de mosquitos e diminuição de infeção plasmódica (Almeida e Billingsley, 2002). Posteriormente, foi identificado o péptido SM1 presente quer no epitélio intestinal, quer nas GS, com a capacidade de bloquear a invasão de plasmódios em mosquitos transgênicos (Ghosh *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002). Da mesma forma, anticorpos contra carboxipeptidases B de *An. gambiae* reduziram

drasticamente a penetração de *P. falciparum* e *P. berghei* (Lavazec *et al.*, 2007).

Ensaio de interação proteica, realizados no nosso laboratório, indicaram possíveis moléculas candidatas para pares ligando-recetor, no epitélio intestinal de *An. gambiae*, tais como as superiores a 220, 200 e 48 kDa, e nos oocinetos de *P. berghei*, tais como os de 116, 45 e 21 kDa. Por espectrometria de massa, foi identificada uma molécula homóloga ao antigénio Pf EBA-165 como candidata a ligando dos oocinetos ao epitélio intestinal (Toubarro *et al.*, 2010).

Outra questão por nós investigada tem sido a possível suscetibilidade do antigo vetor de malária em Portugal, *An. atroparvus*, a plasmódios importados, dado o perigo representado pelas alterações climáticas e crescente nº de casos de malária de importação. Apesar de, numa primeira tentativa, este vetor se ter mostrado refratário a *P. falciparum* de origem africana (Ribeiro *et al.*, 1989), experiências recentes demonstraram que, em condições específicas de temperatura e de RS, há, de facto, suscetibilidade de *An. atroparvus* de Portugal a *P. falciparum* da estirpe NF54, com prevalências de infeção que podem atingir 13,5%, com uma média de 14 oocistos por intestino médio, num intervalo entre 2 e 75 oocistos (Sousa, 2008). A capacidade vetorial foi, contudo, baixa, donde o risco para a reintrodução da malária em Portugal foi considerado um evento possível mas improvável no atual contexto (Sousa, 2008).

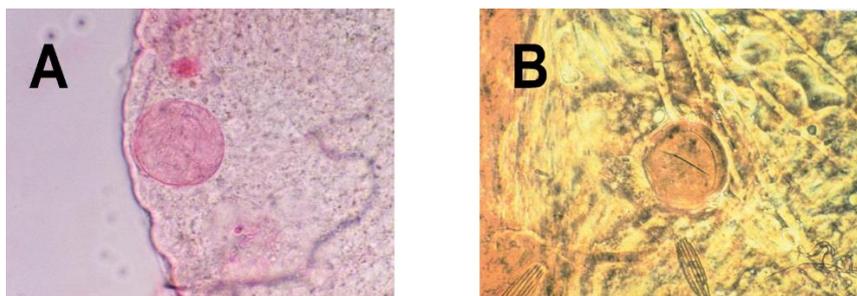


Fig. 8 – Oocistos de *Plasmodium berghei* em intestinos médios de *Anopheles stephensi*. A) Preparação a fresco; B) com coloração por mercúrio-cromo 2%. Microscópio ótico Zeiss (ampliações: 200X e 400X, respetivamente) (Foto de Almeida, APG).

O desenvolvimento do parasita e a sua transmissão ao hospedeiro seguinte dependem dos oocinetos que atravessam a barreira epitelial do intestino médio e se diferenciam em oocistos, dentro dos quais se irão desenvolver os

esporozoítos. O desenvolvimento dos oocistos é relativamente longo, demorando cerca de 10 a 12 dias, tempo após o qual os esporozoítos são libertados no hemocélio.

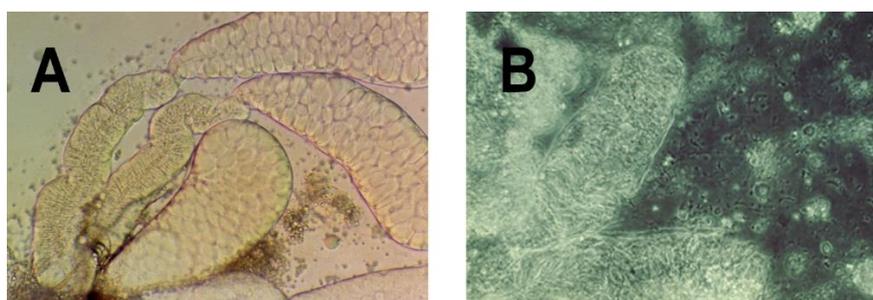


Fig. 9 – Glândulas salivares de *Anopheles stephensi*: A) não infetadas; B) infetada com esporozoítos de *Plasmodium berghei*. Preparação a fresco, microscópio ótico Zeiss (ampliações: 100X e 400X, respetivamente) (Foto de Almeida, APG).

Durante a diferenciação do parasita no mosquito, existem grandes flutuações na carga parasitária. O espaço temporal que medeia a rutura do oocistos, a libertação de esporozoítos para o hemocélio e a invasão das GS, resulta em redução substancial do seu número, provavelmente resultante de barreiras físicas, mecanismos fisiológicos e do sucesso da resposta imunitária do mosquito. Nem todos os esporozoítos saídos dos oocistos chegam às GS; em *An. gambiae*, 97% dos esporozoítos de *P. falciparum* vão para as GS (Vaughan *et al.*, 1992), contra apenas cerca de 20% dos esporozoítos de *P. vivax* (Rosenberg e Rungsiwongse, 1991). Apesar de apenas cerca de 19% dos esporozoítos libertados invadir eficazmente as GS (Hillyer *et al.*, 2007), esta continua a ser uma das fases menos estudadas do ciclo de vida do parasita.

Dentro do oocisto, formam-se os esporozoítos que perfuram a cápsula e saem para a hemolinfa do

mosquito, distribuindo-se no hemocélio e concentrando-se nas GS. A saída dos parasitas dos oocistos leva a alguma reestruturação do epitélio, com alteração da expressão de genes associados ao citoesqueleto, como a tubulina (Félix e Silveira, 2011), e produção de óxido nítrico (NO) (Han *et al.*, 2000; Luckhart *et al.*, 1998). As moléculas deste composto desencadeiam uma resposta que envolve ativação de diversos genes detoxificantes (Félix *et al.* 2010). Neste contexto, os citocromos P450 estão profundamente envolvidos na resposta do mosquito à infeção por *Plasmodium* (Félix e Silveira, 2012), tendo um papel importante em diferentes estádios de desenvolvimento do parasita e abrangendo diferentes tecidos do mosquito.

A saída dos esporozoítos dos oocistos foi, durante muito tempo, considerada um processo passivo resultante da rutura da parede que envolvia

os milhares de esporozoítos. Contudo, dados mais recentes apontam para um processo ativo que envolve diversas moléculas do parasita, como a proteína circum-esporozoítica (CSP) (Wang *et al.*, 2005) e proteases cisteínicas (Aly e Matuschewski, 2005).

Uma vez no hemocélio, os parasitas tornam-se vulneráveis aos hemócitos, que medeiam a resposta humoral e celular na hemolinfa. As contribuições para a resposta humoral incluem a síntese de péptidos antimicrobianos (AMP) e a produção e secreção de proteases extracelulares, que participam nas cascatas de ativação de processos como a melanização e a coagulação. Durante as respostas celulares, os hemócitos estão presente no local da infecção e em contacto com o agente patogénico, desencadeando mecanismos efetores, como a fagocitose e a encapsulamento.

Os mosquitos possuem vários tipos de hemócitos, que foram classificados por Hillyer e Christensen (2002), para *Ae. Aegypti*, em quatro tipos celulares, conforme a morfologia, a ligação a lectinas e atividade enzimática: granulócitos, oenocitoides, adipo-hemócitos e trombocitoides. O mesmo tipo de hemócitos, com exceção de trombocitoides, foi observado em *An. gambiae* por Castillo *et al.* (2006). No entanto, ainda não está claro, para ambas as espécies, qual o tipo de hemócitos que é ativado ou os mecanismos específicos que promovem.

Cada oocisto dá origem a cerca de 4000 esporozoítos repondo e aumentando o número de parasitas de novo. Os esporozoítos fluem juntamente com a hemolinfa até atingirem as GS. Durante esta fase, os hemócitos desempenham um papel importante no controlo da infecção, contudo, a grande redução do número de parasitas não pode ser explicada exclusivamente por mecanismos de fagocitose, estando provavelmente envolvidos mecanismos de lise celular (Hillyer *et al.* 2003). A rápida chegada às GS é importante para o sucesso da invasão, estando envolvida a mobilidade do parasita por deslizamento (*gliding*), como demonstrado pelo silenciamento do gene da proteína anónima relacionada com a trombospodina (TRAP) de *Plasmodium*, que codifica uma proteína fundamental a este processo e cujo silenciamento impede a invasão das GS (Sultan *et al.*, 1997). A melanização é um mecanismo imunitário efetor que consiste na deposição de uma camada de melanina sobre os microrganismos para evitar a propagação da infecção, permitindo a morte localizada do microrganismo, seja por citotoxicidade através de produtos secundários da melanização, como

intermediários reativos de oxigénio e nitrogénio (ROI e RNI, respetivamente), seja por outros mecanismos efetores. O reconhecimento microbiano ativa uma cascata de proteases serínicas na hemolinfa que, sequencialmente, ativa, através de proteólise, a protease seguinte, culminando com a clivagem da profenoloxidase (PPO), convertendo-a fenoloxidase (PO) e, subsequentemente, conversão da tirosina em melanina.

A melanização de oocinetos de *Plasmodium* em *An. gambiae* é regulada por moléculas, tais como TEP1, SRPN6 e algumas proteases serínicas com motivo CLIP (Abraham *et al.*, 2005; Blandin *et al.*, 2004; Volz *et al.*, 2006). A maioria dos estudos realizados até agora refere-se à fase de intestino médio de infecção por *Plasmodium* no mosquito. Mesmo assim, a melanização de esporozoítos foi demonstrada na hemolinfa de *Ae. aegypti* (Hillyer *et al.*, 2003) e no nosso laboratório. O tratamento de *An. gambiae* com *N*-feniltioureia, um inibidor da PO, resultou num aumento significativo de esporozoítos nas GS, sugerindo envolvimento deste mecanismo efetor no controlo da infecção na hemolinfa (dados não publicados).

O esporozoíto segue uma via intracelular através do epitélio das GS, de modo a chegar até ao ducto salivar. No entanto, os eventos biológicos decorrentes da invasão pelos esporozoítos são distintos dos que ocorrem na invasão pelos oocinetos. O esporozoíto entra no epitélio pelo lado basal e, durante a invasão celular, encontra-se inicialmente envolvido por um vacúolo parasitóforo transitório (Rodriguez e Hernandez-Hernandez, 2004) cuja formação não está ainda totalmente esclarecida, assim como também não se sabe exatamente como é que o parasita escapa deste vacúolo e sai para a cavidade secretória. Contrariamente ao que acontece no intestino médio, nesta fase da invasão, não são observados efeitos nas células hospedeiras invadidas, não havendo registo de apoptose ou rearranjos na actina. Inclusivamente, a expressão do gene da sintetase de óxido nítrico (NOS) não se altera ou é apenas sub-regulada (Dimopoulos *et al.*, 1998; Rosinski-Chupin *et al.*, 2007), assim como não é possível detetar a própria NOS (Pinto *et al.*, 2008).

Apesar de contactarem com diferentes órgãos e tipos de células, os esporozoítos libertados pelos oocistos apenas invadem as GS, o que implica o reconhecimento ativo deste órgão, processo mediado por interações receptor-ligando específicas da espécie, conforme demonstrado por Rosenberg (1985), associadas à mobilidade específica dos esporozoítos e à formação de juntas

móveis (Mueller *et al.*, 2010; Pimenta *et al.*, 1994; Sultan *et al.*, 1997).

Várias proteínas dos micronemas têm sido descritas como potencialmente envolvidas no processo de invasão das GS, assim como na mobilidade dos esporozoítos. A proteína CSP tem uma região de cinco aminoácidos, denominada de “Região I”, cuja deleção impede a invasão das glândulas (Myung *et al.*, 2004; Sidjanski *et al.*, 1997). A adesão às GS é ainda favorecida por uma proteína específica, a *apical membrane antigen/erythrocyte binding-like protein* (MAEBL) (Kariu *et al.*, 2002), cujo papel na mobilidade do plasmódio no mosquito ainda não está clarificado. Uma terceira proteína envolvida é a TRAP, um membro da família das invasinas, que não está envolvida no passo inicial de ligação às glândulas, mas assume um papel importante na mobilidade (por deslizamento) do plasmódio.

Para algumas destas proteínas, já foram identificados recetores específicos nas GS. No hospedeiro vertebrado, a proteína CSP dos esporozoítos, através de um motivo de ligação à heparina, liga-se ao sulfato de heparano que reveste os hepatócitos; no mosquito, a mesma proteína reconhece este glicosaminoglicano presente na superfície das GS (Armistead *et al.*, 2011; Sinnis *et al.*, 2007). Também foi identificada uma outra proteína, denominada SGS1, pertencente a uma família de proteínas de superfície (o acrónimo “SGS” deriva da expressão inglesa *salivary gland surface*), com capacidade de ligação a glicosaminoglicanos e, eventualmente, com papel indireto na invasão do mosquito (Korochkina *et al.*, 2006). No nosso laboratório, estamos a realizar experiências no sentido de estabelecer uma ligação entre as transglutaminases e o sulfato de heparano do mosquito. Oakulate e colaboradores (2007) identificaram uma proteína denominada saglina, localizada à superfície das GS, que foi recentemente estabelecida, *in vitro*, como recetor

da TRAP (Ghosh *et al.*, 2009), mais especificamente através da interação do domínio A desta proteína com a saglina. Os mesmos autores concluíram também que o péptido SM1 anteriormente referido mimetiza a região da proteína TRAP que interage com a saglina e, por esse motivo, poderá funcionar como bloqueador da invasão.

Depois de invadir o epitélio das GS, o esporozoíto chega ao lúmen da cavidade secretora. Não se sabe se, depois de chegar ao citoplasma das células epiteliais, o parasita adquire uma forma de migração unidirecional ou como é que o esporozoíto abre caminho pela membrana apical. Uma vez dentro da cavidade, os esporozoítos associam-se em grupos através de um mecanismo ainda desconhecido. Um pequeno número de esporozoítos entra no ducto secretório, muito embora também não se saiba o que os leva a dissociar-se e a entrar nestes ductos.

Um aspeto a salientar da estadia do esporozoíto dentro do mosquito é a sua passagem de forma não-invasiva, enquanto esporozoíto dentro do oocisto, a uma forma altamente infecciosa, depois de estar dentro das GS, o que, de alguma maneira, sugere a existência de fases de maturação, ainda não identificadas, durante esta fase de invasão.

Dentro do mosquito, o plasmódio tem que ultrapassar várias barreiras físicas, como a MP, o epitélio do intestino médio e as GS de modo a completar o seu ciclo de vida. No entanto, conforme aqui referido, a base molecular que permite o estabelecimento destas interações não é totalmente conhecida, apesar dos muitos trabalhos desenvolvidos nesta área, como aqui se tentou resumir. O aumento do conhecimento sobre a base molecular de interações entre vetor e parasita irá permitir explorar e utilizar estas mesmas interações no controlo da transmissão desta doença.