

## **A imunomodulação do pigmento malário (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas?**

As infecções bacterianas disseminadas constituem um grave problema de saúde em África, contribuindo para uma elevada morbilidade e mortalidade<sup>1</sup>. Actualmente considera-se que diversos factores representam um risco acrescido para o desenvolvimento de sépsis bacteriana nesta região do globo. Entre estes factores encontra-se a infecção por *Plasmodium* spp. De facto, co-infecções entre malária e outros agentes patogénicos são frequentes no continente Africano.

Algumas infecções, como a sépsis, são alvo de diversos estudos, essencialmente devido às graves consequências que acarretam tanto em crianças como em adultos. No entanto, certos agentes bacterianos parecem ser mais frequentemente encontrados em culturas sanguíneas de doentes com malária, em particular *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* não-tifoide.

A co-infecção disseminada por *Salmonella* não-tifoide, especificamente com *Salmonella* entérica serótipo Typhimurium, foi relacionada à lise eritrocitária que ocorre durante a infecção com *Plasmodium* spp. Pensou-se que a hemólise conduziria a uma acção bactericida reduzida por parte dos macrófagos. No entanto, verificou-se recentemente que uma bacteriemia associada a uma anemia causada por *Plasmodium* spp. é muito mais severa do que uma bacteriemia associada a uma hemólise mecânica. Isso indica que outros factores específicos da infecção pelo parasita contribuem para o agravamento da sépsis bacteriana em doentes com malária<sup>3</sup>.

O pigmento malárico ou hemozoína é apontada como tendo propriedades imunomoduladoras<sup>4</sup>. No decorrer da fase intra-eritrocitária o parasita promove a clivagem proteolítica da hemoglobina a partir da qual se liberta o grupo heme na forma de protoporfirina IX. O heme livre é altamente tóxico para o parasita. Assim, o parasita forma um cristal de dímeros hémicos – a hemozoína ou pigmento malárico – com o objectivo de detoxificar o heme livre. Este bio-cristal acumula-se nas células fagocitárias após a rotura dos eritrócitos. Este bio-produto tem sido apontado como um dos factores responsáveis pela imunomodulação associada à malária.<sup>4</sup>

Um estudo investigou o efeito da malária sobre a infecção disseminada por *Salmonella* num modelo murino. Neste estudo verificou-se um aumento de 1000 vezes de unidades formadoras de colónias (U.F.C.) de *Salmonella enterica* serótipo Typhimurium em ratinhos com malária, relativamente a ensaios controlo. No entanto quando a hemólise é mediada por anticorpos apenas foi registado um aumento de 10 vezes. Interessantemente, os investigadores relataram a observação de hemozoína nos macrófagos dos ratinhos co-infectados.<sup>3</sup>

No entanto, ainda não foi estabelecido se a hemozoína é o factor causal desta observação. A nossa hipótese é que a ingestão da hemozoína pelos macrófagos inibe a fagocitose e “bacterial killing” das bactérias. Assim tornou-se pertinente averiguar se a presença da hemozoína influencia a predisposição que os doentes com malária têm para adquirir infecções bacterianas disseminadas.

De forma a testar o efeito da hemozoína na capacidade fagocitária de monócitos e granulócitos estes foram pré-incubados com diferentes concentrações de hemozoína ou sozinhos. Após esta pré-incubação quantificou-se a capacidade de realizar a

subsequente fagocitose, isto é se os fagócitos que tinham ingerido hemozoína seriam ainda capazes de exercer a sua função – fagocitar uma partícula estranha. Para este fim utilizou-se partículas bacterianas marcadas com um fluorocromo que apenas fluoresce a pH ácido (pHrodo™), como o encontrado no interior do fagossoma. Tomando partido desta propriedade é possível quantificar as partículas ingeridas, por citometria de fluxo. Utilizou-se também uma estirpe de *Salmonella enterica*, serótipo Typhimurium que expressa uma proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*).

Este ensaio é vantajoso relativamente aos ensaios com partículas bacterianas marcadas com pHrodo™, uma vez que permite a utilização de bactérias viáveis. A utilização de bactérias viáveis permite reproduzir *in-vitro* com mais exactidão os mecanismos desencadeados pela ingestão das bactérias. Além disso permite analisar em paralelo a fagocitose e a capacidade bactericida.

A capacidade bactericida das células fagocitárias após ingestão de hemozoína foi acedida a partir da pré-incubação destas células com hemozoína e posteriormente foram infectadas com bactérias viáveis (*Salmonella enterica*, serótipo Typhimurium). Subsequentemente estas células foram lisadas, de forma a libertar as bactérias ingeridas mas que não foram degradadas, e realizou-se culturas quantitativas (determinação de unidades formadoras de colónias). Isso permite determinar uma taxa de sobrevivência de *Salmonella* quando comparada com os resultados do ensaio controle, no qual a fagocitose ocorre na ausência de hemozoína.

## **Resultados obtidos**

Monócitos e granulócitos pré-incubados com 50  $\mu$ M de hemozoína apresentam uma capacidade fagocítica comprometida relativamente a amostras controlo (que não foram incubadas com hemozoína), num factor de 90% e 50% respectivamente. Este efeito inibitório é dependente da dose de hemozoína utilizada e do tempo de pré-incubação da hemozoína com os fagócitos.

Os ensaios com *Salmonella enterica*, serótipo Typhimurium GFP positive também revelaram diferenças entre as amostras de monócitos e granulócitos pré-incubadas com hemozoína e as amostras controlo. As bactérias fagocitadas por monócitos previamente incubados com hemozoína apresentaram uma maior viabilidade do que as bactérias que foram fagocitadas por monócitos não pré-incubados com hemozoína. Este facto aponta para que os monócitos previamente incubados com hemozoína tenham as suas funções comprometidas, impedindo-os de degradar a bactéria ingerida.

A hemozoína parece comprometer a capacidade fagocítica e bactericida de monócitos e granulócitos.

A fagocitose tem um papel crucial na defesa do organismo contra agentes infecciosos externos. Além de ajudar a suprimir a infecção, através da degradação da partícula ingerida (a bactéria) pela acção de enzimas líticas, vai também proporcionar a apresentação de antigénios à superfície da membrana. Estes antigénios são pequenos péptidos resultantes da acção degradativa das enzimas anteriormente mencionadas, e vão-se associar ao receptor MHC (do inglês *major histocompatibility complex*) com o propósito de activar a imunidade adaptativa. Assim, caso os mecanismos de fagocitose

se encontrem comprometidos pode proporcionar a evasão de bactérias ao sistema imunitário e a consequente proliferação, originando a disseminação da infecção.

Os resultados obtidos neste trabalho podem clarificar o facto dos doentes com malária apresentarem uma maior predisposição para a disseminação de infecções bacterianas. A hemozoína pode ser o factor específico da infecção por malária responsável por esta co-relação. No entanto devido à complexidade tanto da infecção por malária, como dos mecanismos associados à fagocitose como dos mecanismos que levam à disseminação de uma infecção bacteriana, será importante realizarem-se estudos adicionais que permitam clarificar as interacções existentes.

#### **Referências Bibliográficas:**

1. Bassat Q, Guinovart C, Sigauque B, *et al.* Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. *Tropical Medicine and International Health* 2009; 14 (9): 1011-9.
2. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010; 10:417-32.
3. Roux MC, Butler BP, Chau JY, *et al.* Both Hemolytic Anemia and Malaria Parasite-Specific Factors Increase Susceptibility to Nontyphoidal *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium Infection in Mice. *Infection and Immunity.* 2010; 78(4): 1520-7.
4. Hänscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. Hemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:675-85.