



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

**Doutoramento:**

Ciências Biomédicas

**Nome do Aluno:**

Sílvia Vilar Portugal

**Tema da Tese:**

Interactions of plasmodium blood and liver stages within a single host

**Área:**

Ciências Biomédicas

**Especialidade:**

Ciências Biopatológicas

**Data da Defesa:**

18-06-2010

**Classificação:**

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

**Júri:**

Presidiu o Vice - Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor José Melo Cristino e estiveram presentes os vogais Doutores: Victor Nussenzweig, da New York University, Elena Levashina, do Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire Université de Strasbourg, Maria Salomé Custódio Gomes, do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, Pedro Victor Lemos Cravo, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, Maria Manuel Dias Mota, Thomas Hanscheid, Luísa Miranda Figueiredo, todos da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

## RESUMO

A infecção pelo agente causador da malária, o parasita *Plasmodium*, encontra-se ainda hoje disseminada pelas populações de 108 países no mundo. A malária produz sintomas que variam entre febres ligeiras até ao coma, anemia severa, síndrome respiratória aguda ou malária cerebral. Só em 2008 esta infecção foi responsável por mais de 800000 mortes, das quais a maioria se ficou a dever ao parasita *Plasmodium falciparum*.

Adicionalmente a malária é ainda responsável por uma redução de 1.3% no crescimento económico dos países de maior endemicidade.

O parasita *Plasmodium*, pertence ao filo Apicomplexa e partilha com o Homem a presença na Terra desde o próprio aparecimento da espécie humana, tendo a adaptação parasita-hospedeiro vindo a evoluir ao longo do tempo, procurando um balanço entre a transmissão do parasita e a sobrevivência do hospedeiro.

É com a picada de uma fêmea de mosquito *Anopheles* que o parasita chega ao hospedeiro mamífero. Depois de uma passagem pela pele, os esporozoítos migram via corrente sanguínea até ao fígado onde depois de atravessar vários hepatócitos, invadem um último com a formação de um vacúolo parasitário. No hepatócito dá-se um processo de crescimento e replicação que no homem demora vários dias até à formação de vários milhares de merozoítos que serão libertados de novo na corrente sanguínea. Uma vez no sangue os merozoítos entram numa nova fase de reprodução assexuada, com sucessivos ciclos de invasão de eritrócitos, replicação e libertação para a corrente sanguínea e nova invasão de eritrócitos. É nesta fase da infecção que todos os sintomas associados à malária surgem.

Ocasionalmente, o ciclo de reprodução assexuada dentro dos eritrócitos para formação de novos merozoítos é substituído pela formação de gametócitos femininos ou masculinos que poderão ser aspirados durante uma nova picada de mosquito. É no hemocélio deste vector que se dá a fase sexual do parasita da malária com a formação de um zigoto e subsequente oocineto que migra para a lâmina basal onde se transforma num oocisto. A partir da esquizogonia dos oocistos surgem novos esporozoítos que uma vez chegados às glândulas salivares do mosquito estão prontos para que se inicie uma nova infecção.

Em zonas de alta transmissão de *Plasmodium* é provável a ocorrência de sobreposição das fases hepática e sanguínea num só hospedeiro, bastando para isso que uma picada infecciosa ocorra num indivíduo que alberga já uma infecção circulante proveniente de uma picada anterior. Apesar de potencialmente importantes, as possíveis interações entre as diferentes fases de desenvolvimento do parasita e o hospedeiro que os acolhe nunca foram objecto de estudo.

O objectivo desta tese prende-se precisamente com o estudo das interacções que surgirão desta situação a que damos o nome de re-infecção. Quão efectivos serão os esporozoítos na infecção do fígado de indivíduos com *Plasmodium* no sangue, quando comparados com a infecção do fígado de indivíduos sem qualquer parasita de malária presente?

Fazendo uso de modelos animais previamente estabelecidos e diferentes clones de parasitas, que nos permitiram distinguir as infecções hepática e sanguínea nos animais re-infectados, verificámos uma redução fortíssima na infecção no fígado de animais re-infectados.

A capacidade dos esporozoítos para infectar hepatócitos de ratinhos com infecção sanguínea a decorrer apareceu altamente limitada quando comparada com a mesma capacidade para infectar hepatócitos de ratinhos naive.

O estudo detalhado deste fenómeno permitiu-nos relacionar a redução da infecção hepática com a diminuição tanto do número como do desenvolvimento das formas exoeritrocíticas (EEF no original) no fígado. Esta redução verificou-se independente do nível da parasitemia da

infecção primária, desde que esta se encontrasse acima de um valor que se mostrou ser baixo e rapidamente atingido. Mais ainda, verificou-se que a administração de um tratamento anti-malárico aos ratinhos infectados com *Plasmodium* no sangue antes da re-infecção, resulta na perda deste efeito protector.

Várias hipóteses, baseadas em trabalhos anteriores a este e num estudo de expressão genética que realizámos para melhor compreender as alterações hepáticas em resposta à presença de *Plasmodium* no sangue, foram colocadas na tentativa de entender o mecanismo pelo qual se observa tamanha redução na infecção de fígado de ratinhos reinfectedos.

Diversas moléculas associadas ao sistema imunitário, à inflamação e à apoptose no fígado foram testadas por meio de ratinhos transgénicos, ou pelo uso de anticorpos depletantes ou drogas bloqueantes sem que nenhum dos factores testados indicasse ser relevante.

A infecção de hepatócitos co-cultivados com eritrócitos infectados com *Plasmodium*, não mostrou ser eficiente em produzir o mesmo tipo de redução, afastando a hipótese de um factor solúvel libertado pelo eritrócito infectado.

Ao avaliar alterações no fígado relacionadas com a disponibilidade de nutrientes verificámos que o gene codificante da hepcidina reguladora do ferro, hepcidina se encontrava sobre-expresso no fígado de animais com parasitas no sangue. Sabendo que a disponibilidade de ferro pode limitar o crescimento de vários patogénios incluindo o *Plasmodium*, perguntamo-nos se seria esse o cerne da redução na infecção verificada.

A expressão do gene codificante da hepcidina provou estar intimamente ligada à presença de eritrócitos infectados no sangue de ratinhos, subindo rapidamente com poucos ciclos replicativos de *Plasmodium* no sangue, e voltando rapidamente a valores basais com o tratamento anti-malárico, o que rapidamente reduz a parasitemia para zero permitindo então que a infecção hepática se processe como em ratinhos naive. Além disso, pôde verificar-se uma redistribuição de ferro no fígado, perdendo-se parte do conteúdo nos hepatócitos para incrementar o conteúdo em macrófagos residentes e infiltrados no fígado.

Adicionalmente, mostrou-se que a hepcidina *per se* pode reduzir a infecção hepática. A administração a ratinhos de um adenovírus expressando o gene codificante desta hormona reguladora de ferro confirmou que este componente promovido pelo parasita no sangue, mesmo na sua ausência, pode actuar limitando a infecção por esporozoítos.

Ao tentar perceber a implicação destes resultados na malária humana, deparamo-nos com dados epidemiológicos há muito conhecidos mas parcamente explicados. Em áreas altamente endémicas é conhecido consistentemente que a incidência da infecção aumenta inicialmente com a idade das crianças para depois decrescer, possivelmente pela acção da imunidade adquirida. Ao mesmo tempo, a complexidade da infecção, em número de clones de parasitas diferentes no sangue de indivíduos, aumenta à medida que as crianças crescem em idade.

Dividindo um modelo baseado unicamente na existência de um valor mínimo de parasitemia que inibisse o estabelecimento da infecção hepática, tal como foi observado no decurso desta tese, e assumindo o há muito estabelecido, que a densidade de parasitas no sangue decresce com a idade dos indivíduos. Institui-se então que a probabilidade de um picada infecciosa produzir infecção depende do nível de parasitemia no momento da infecção e da história clínica do hospedeiro no que concerne a episódios prévios. Sob estas assumpções mínimas o modelo criado prevê correctamente um aumento inicial de infecções nas crianças seguindo-se um declínio à medida que os indivíduos adquirem imunidade devido a repetidas infecções. Quer isto dizer que uma densidade mínima de parasitas no sangue, da qual dependa a inibição de novas infecções de *Plasmodium* no fígado, pode por si justificar o aumento do risco de infecção e crescente complexidade das mesmas em crianças novas.

A aplicação do modelo com os resultados esperados é mais proeminentemente observada quando testado segundo áreas com taxas de transmissão moderadas ou elevadas, e permite explicar ainda algumas diferenças de incidência da doença ao longo da idade das crianças em áreas com diferentes taxas de transmissão.

O ciclo de vida do *Plasmodium* tem vindo a desenvolver-se ao longo de milhões de anos de co-evolução das interações hospedeiro-parasita, com implicações importantes para a saúde humana. A infecção de eritrócitos acima de uma densidade mínima eleva a produção da hormona reguladora do ferro, hepcidina, que redistribuindo o ferro protege o nicho do parasita existente, inibindo o estabelecimento de uma infecção secundária, prevenindo assim a superinfecção. Este fenómeno actua independentemente e de forma complementar à imunidade adquirida e vem aclarar observações epidemiológicas prévias, podendo ainda ter implicações em futuras intervenções na luta contra a malária.

**Palavras-chave:** malária, re-infecção, superinfecção, hepcidina, ferro