

ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À CO-INFECÇÃO POR *Salmonella* NÃO-TIFOIDE E MALÁRIA EM CAMUNDONGOS

Roberto Wilker Agra BARBOSA¹
Gemilson Soares PONTES²

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/FAPEAM;

²Orientador CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

Existem diversos tipos de sorotipos de *Salmonella*, os quais estão inclusos os agrupados como *Salmonella* entérica, que são capazes de causar doenças em humanos e são normalmente associados aos causadores da febre tifóide e os sorotipos *Salmonella* não-tifóide, que incluem *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, as quais são responsáveis por causar infecções entéricas e doença invasora (Takem *et al.* 2014).

Uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças africanas e adultos imunocomprometidos é a bacteremia causada por SNT (Feasey *et al.* 2012), estudos anteriores também tem demonstrado expressiva relação entre malária e bacteremia por SNT em crianças na África sub-sariana (Snow *et al.* 2004; Roux *et al.* 2010).

O *Plasmodium berghei* é transmitido pelo mosquito do gênero *Anopheles*, responsável por transmitir malária em humanos, o principal interesse nesse parasita é de fazer estudos experimentais da malária humana por ser considerado um modelo genético similar ao humano (Pennacchio 2003).

Contudo, estudos recentes realizados no Kenia, demonstraram que episódios agudos por *Plasmodium falciparum* predispõe o desenvolvimento de bacteremia por microrganismos gram-negativos, o que contribuiria para o desenvolvimento de malária severa (Scott *et al.* 2011), diante disso, é possível que os casos de co-infecção entre malária e STN possam ser subestimados em pacientes hospitalizados.

Já foram documentados casos de malária vivax severa e sepse incluindo falência múltipla de órgãos, porém não houve isolamento e identificação do agente causador da sepse (Tan *et al.* 2008; khochar *et al.* 2009). Apesar dos relatos, o conhecimento em relação à imunopatogênese do processo de bacteremia resultante da co-infecção por STN e Malária é muito pouco.

Diante do que foi apresentado acima, torna-se imprescindível o estabelecimento de modelos animais que possibilitem a realização de estudos relacionados à patogenia da co-infecção malária e STN no desenvolvimento da bacteremia, seguida por sepse grave.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas bacterianas e as cepas do *Plasmodium berghei* foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz de Manaus.

Todas as cepas foram cultivadas em caldo Muller Hinton a 37 °C 12-18 horas. Em seguida, foi transferido 1 ml do cultivo bacteriano para 400 ml de caldo Muller Hinton que foi cultivado a 37 graus em rotação de 160 rpm por 5 horas. Após o período de incubação, o material foi centrifugado a 12 rpm por 10 minutos e em seguida ressuspensionado em solução salina em volume adequado de acordo com a quantidade de animais a serem infectados. Cada camundongo foi infectado oralmente com 200 uL de suspensão bacteriana (técnica de gavagem) que correspondente a 2×10^8 UFC/mL de acordo com o protocolo previamente padronizado (Hase

et al. 2009). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (23/2014) para analisar os aspectos éticos envolvendo pesquisas com animais, visando garantir que as diretrizes preconizadas pela Lei 11.794/2008 que regulamenta e estabelece os procedimentos para uso de animais com fins científicos. Os camundongos utilizados são de linhagem BALBc de ambos os sexos com idade entre 6 e 10 semanas. Todos os animais foram mantidos em condições convencionais no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Os experimentos de infecção envolvendo Malária, foram inoculados intraperitonealmente aproximadamente 4×10^7 de eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* em volume de 150 μ L de solução salina em camundongos BALBc de ambos os sexos (Lokken et al. 2014). A infecção envolvendo as cepas bacterianas foi utilizado um inóculo de aproximadamente 10^8 via oral por meio de gavagem. Três grupos de animais foram utilizados conforme a estratégia de infecção: SNT, *Plasmodium-SNT* e *Plasmodium*, cada grupo contendo 5 animais.

A coleta de sangue foi feita via punção cardíaca, sendo aplicada a coleta via plexo orbital antes da infecção dos animais, dentro da capela de exaustão. A coleta via punção cardíaca foi utilizada após infecção dos animais, administrando anteriormente sedativo (ketamina/xilasina) na proporção indicada pelo fabricante (proporção 7:3). Após os animais estarem sedados, o sangue foi coletado com auxílio de uma seringa de insulina. Após a coleta, o sangue foi transferido para microtubos e transportados ao laboratório de virologia onde foram processados e armazenados até o momento do uso.

Foram coletados baço e linfonodo mesentérico após 48h de infecção por SNT ou *Plasmodium-SNT* para quantificação de bacteremia, conforme o protocolo (Hase et al. 2009). Todos os tecidos foram homogeneizados com meio de cultura DMEN, e foram semeados em diluição seriada em meio de cultura Agar Muller Hinton. Após 12 horas as unidades formadoras de colônias foram quantificadas.

Para os testes histoquímicos foram coletados placas de peyer e lâmina própria após 3 semanas de infecção por *Plasmodium Berghei* para pesquisar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo microrganismo utilizado. Os tecidos foram higienizados com meio de cultura DMEN, PBS e formol a 10%. Após a higienização os tecidos foram submetidos à técnica de clareamento e impregnação, para posteriormente serem confeccionados os blocos de parafina. Todos os blocos foram cortados em micrótomo a 0,7mm e inseridos a lâminas de vidro para serem coradas e posteriormente analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um experimento com SNT, *P. Berghei* e co-infecção *Plasmodium-SNT* com intuito de padronizar e analisar todos os procedimentos. Primeiramente, foi realizada a inoculação do *P. berghei* no camundongo de linhagem BALBc e o desenvolvimento da parasitemia foi investigado com intuito de compreender a cinética replicativa do parasita no animal. A infecção foi acompanhada semanalmente até chegar entre 20-30%. A cinética foi realizada no sentido de verificar de que forma o parasita/doença se desenvolve no animal.

Após a co-infecção *plasmodium-salmonela*, a quantificação das unidades formadoras de colônias foi feita visualmente. Os resultados demonstraram que os camundongos que eram co-infectados com *salmonela-plasmodium* desenvolviam processo de bacteremia seguido por septicemia por SNT em comparação aos camundongos apenas infectados oralmente com *salmonela*. Isto foi evidenciado por meio da presença de bactérias no sangue e órgãos linfoides secundários 48 horas após a infecção nos animais co-infectados,

enquanto que nos animais infectados apenas com salmonela, foi observado a presença de bactérias nos órgãos acima citados apenas 4 dias pós-infecção, o que evidencia a susceptibilidade a septicemia por SNT em organismos infectados por *Plasmodium*.

CONCLUSÃO

A quantificação das unidades formadoras de colônias foi feita por contagem manual, evidenciando a presença de 1 (uma) colônia na placa de petri contendo macerado tecidual não diluído do baço sob co-infecção, 3 (três) colônias na placa de petri contendo sangue não diluído sob co-infecção.

Os experimentos com infecção unicamente por SNT obtiveram resultados negativos, pois não houve crescimento bacteriano. Constatando dessa forma, a suscetibilidade a bacteremia por SNT causada pela infecção por *P. berghei*.

Até a presente data os testes de histoquímica estão sob análise para melhor compreensão do processo de inflamação e suscetibilidade a bacteremia causada por malária.

Porém, há necessidade de novos experimentos, incluindo técnicas de citometria de fluxo para avaliação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo de infecção para obtenção de resultados mais expressivos.

REFERÊNCIAS

- Feasey, N.A.; Dougan, G.; Kingsley, R.A.; Heyderman, R.S.; Gordon, M.A. 2012. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, 379: 2489–2499.
- Kochar, D.K.; Das, A.; Kochar, S.K.; Saxena, V.; Sirohi, P.; Garg, S.; Kochar, A.; Khatri, M.P.; Gupta, V. 2009. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 194–198.
- Mackenzie, G.; Ceesay, S.J.; Hill, P.C.; Walther, M.; Bojang, K.A.; Satoguina, J.; Enwere, G.; D'Alessandro, U.; Saha, D.; Ikumapayi, U.N.A.; O'Dempsey, T.; Mabey, D.C.W.; Corrah, T.; Conway, D.J.; Adegbola, R.A.; Greenwood, B.M. 2010. A decline in the incidence of invasive non-typhoidal Salmonella infection in the Gambia temporally associated with a decline in malaria infection. *PLOS ONE*, 5(5): e10568.
- Pennacchio, L.A. 2003. Insights from human/mouse genome comparisons. *Mamm. Genome*, 14: 429–436.
- Roux, C.M.; Butler, B.P.; Chau, J.Y.; Paixao, T.A.; Cheung, K.W.; Santos, R.L.; Luckhart, S.; Tsolis, R.M. 2010. Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to Nontyphoidal *Salmonella* enteric serovar typhimurium infection in mice. *Infection and Immunity*, 78: 1520–1527.
- Scott, J.A.; Berkley, J.B.; Mwangi, I.; Ochola, L.; Uyoga, S.; Macharia, A.; Ndila, C.; Lowe, B.S.; Mwarumba, S.; Bauni, E.; Marsh, K.; Williams, T.N. 2011. Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet*, 378: 1316–1323.
- Sur, D.; von Seidlein, L.; Manna, B.; Dutta, S.; Deb, A.K.; Sarkar, B.L.; Kanungo, S.; Deen, J.L.; Ali, M.; Kim, D.R.; Gupta, V.K.; Ochiai, R.L.; Tsuzuki, A.; Acosta, C.J.; Clemens, J.D.; Bhattacharya, S.K. 2006. The malaria and typhoid fever burden in the slums of Kolkata, India: data from a prospective community-based study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 725–733.
- Snow, R.W.; Korenromp, E.L.; Gouws, E. 2004. Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 16–24.

Tan, L.K.; Yacoub, S.; Scott, S.; Bhagani, S.; Jacobs, M. 2008. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infectious Diseases*, 8: 449–454.

Takem, E.N.; Roca, A.; Cunningham, A. 2014. The association between malaria and non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. *Malaria Journal*, 13: 400.

Yoshida, S.; Nagumo, H.; Yokomine, T.; Araki, H.; Suzuki, A.; Matsuoka, H. 2010. *Plasmodium berguei* circumvents immune responses induced by Merozoite surface Protein 1- and Apical Membrane Antigen 1 – base vaccine. *PLOS ONE*, 5: 1-10.