



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO
HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

ALTERAÇÕES DA MUCOSA INTESTINAL E SUSCETIBILIDADE À *Salmonella* EM CAMUNDONGOS CO-INFECTADOS COM MALÁRIA

YASMIN CABRAL MOREIRA

Manaus - AM

2020



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

YASMIN CABRAL MOREIRA

**ALTERAÇÕES DA MUCOSA INTESTINAL E SUSCETIBILIDADE À
Salmonella EM CAMUNDONGOS CO-INFECTADOS COM MALÁRIA**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. PAULO AFONSO NOGUEIRA

Manaus - AM

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M838a

Moreira, Yasmin Cabral

Alterações da mucosa intestinal e suscetibilidade à *Salmonella* em camundongos co-infectados com malária. / Yasmin Cabral Moreira. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2020.

52 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira.

1. Malária 2. Salmonella I. Título

CDU 616.936:576.8(043.3)

CDD 616.9362

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11 287

AGRADECIMENTOS

Ao universo e toda sua energia, que vai além do nosso alcance, pelo privilégio da oportunidade.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, pelo curso oferecido e pela estrutura do PPG.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal – CAPES; Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio ao PPG e concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Oscar Costa, pela enorme parceria e contribuição no desenvolvimento e conclusão do projeto.

Ao Dr. Alysso Guimarães e à Dra. Patrícia Orlandi, pela coordenação e contribuição essenciais no projeto.

Ao meu ilustríssimo orientador, Dr. Paulo Nogueira, que em toda essa caminhada foi como um pai, que acolhe, ensina, repreende, direciona e reconhece as conquistas, por toda a paciência e dedicação com a minha imaturidade pessoal e intelectual comuns nessa etapa de aprendizado.

Aos colaboradores, Msc. Tatiana Bacry, Msc. Yury Chaves e Dra. Elizângela Farias, por toda a contribuição no desenvolvimento de protocolos e perspectivas de projeto, e conhecimento científico e profissional, vocês são inspiradores.

Aos parceiros de iniciação científica, Dorval Coimbra e Viviane Farias, por todo o auxílio na execução dos experimentos, ficar até mais tarde no laboratório foi mais leve com vocês.

À minha parceira de graduação, laboratório, projetos, risos e choros, Maele Jordão, sem a sua amizade, empatia, garra e companheirismo eu tenho plena certeza que não conseguiria chegar até aqui, cada dia ao seu lado durante esses dois anos foi de imenso aprendizado, serei eternamente grata.

Aos meus pais, Cláudio Moreira e Louize Moreira, por todo o amparo e apoio que tornaram possível essa trajetória, as oportunidades até aqui aproveitadas só foram possíveis graças a vocês.

À minha irmã Nicole Moreira, pelo companheirismo e à minha tia Robertiane Cabral, por todo o apoio.

A todos os meus amigos e minhas amigas, seria injusto citar o nome só de alguns e algumas, e ao parceiro de vida, Felipe Siqueira, pela paciência, contribuição nas horas de descontração necessárias, e por sempre acreditarem em mim.

Muitíssimo obrigada!

RESUMO

Vários mecanismos foram propostos para explicar por que os pacientes com malária são mais suscetíveis às invasões da corrente sanguínea por *Salmonella spp.* No entanto, ainda existem vários fatores críticos desconhecidos a respeito da patogênese da coinfeção. A partir de um modelo de coinfeção, no qual um *S. enterica* sorovar *Typhi* (*S. Typhi*) foi escolhido para desafiar camundongos que haviam sido infectados 24 horas antes com *Plasmodium berghei* ANKA (Pb-ANKA), avaliamos a influência da malária nos níveis de citocinas, a atividade funcional de macrófagos e neutrófilos derivados da medula óssea femoral e seções histológicas intestinais. O perfil de citocinas ao longo de oito dias de coinfeção apresentou exacerbação nas citocinas MCP-1, IFN γ e TNF α em relação ao aumento observado em animais com malária, enquanto animais com mono-infecção por *S. Typhi* apresentaram ligeiro aumento na IL-12. O perfil de citocinas foi associado a uma contagem de neutrófilos e macrófagos consideravelmente reduzida e uma disfunção proeminente, especialmente em neutrófilos *ex vivo* em camundongos co-infectados, embora sem modulação bacteriana que pudesse influenciar a capacidade de invasão de *S. Typhi ex vivo* obtido de macerado de fígado em células não fagocitárias. Por fim, irregularidades na integridade do tecido intestinal evidenciaram rupturas, presença de leucócitos mononucleares e aumento de células caliciformes na camada de enterócitos e grande volume de infiltrado leucocitário na submucosa. A maioria dessas alterações foram observadas em animais mono-infectados com *P. berghei* ANKA e aumentaram significativamente em animais co-infectados. Nossos achados sugerem que a malária causa um desarranjo da homeostase intestinal, exacerbação de citocinas pró-inflamatórias e disfunção em neutrófilos que tornam o hospedeiro suscetível à bacteremia por *Salmonella spp.*

Palavras-chave: *Salmonella*, malária, coinfeção, suscetibilidade, mucosa intestinal anormal

ABSTRACT

Numerous mechanisms have been proposed to explain why patients with malaria are more susceptible to bloodstream invasions by *Salmonella* spp., however there are still several unknown critical factors regarding the pathogenesis of coinfection. From a coinfection model, in which an *S. enterica* serovar Typhi (S_Typhi) was chosen to challenge mice that had been infected 24 hours earlier with *Plasmodium berghei* ANKA (*P.b*_ANKA), we evaluated the influence of malaria on cytokine levels, the functional activity of femoral bone marrow-derived macrophages and neutrophils, and intestinal permeability. The cytokine profile over eight days of coinfection showed exacerbation in the cytokines MCP-1, IFN γ and TNF α in relation to the increase seen in animals with malaria, while animals with S_Typhi monoinfection showed a slight increase in IL-12. The cytokine profile was associated with a considerably reduced neutrophil and macrophage count and a prominent dysfunction, especially in *ex vivo* neutrophils in coinfecting mice, though without bacterial modulation that could influence the invasion capacity of *ex vivo* S_Typhi obtained from liver macerate in non-phagocyte cells. Finally, irregularities in the integrity of intestinal tissue evidenced ruptures in the enterocyte layer, a presence of mononuclear leukocytes in the enterocyte layer, an increase of goblet cells in the enterocyte layer and a high volume of leukocyte infiltrate in the sub-mucosa. Most of these changes were seen in monoinfected animals with *P. berghei* ANKA and were greatly increased in coinfecting animals. Our findings suggest malaria causes a disarrangement of intestinal homeostasis, exacerbation of proinflammatory cytokines and dysfunction in neutrophils that render the host susceptible to bacteremia by *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella*, malaria, coinfection, susceptibility, abnormal intestinal mucosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i> Fonte: Center for Disease Control...	16
Figura 2: Modelo de eventos na patogênese da infecção por <i>Salmonella</i> e genes de virulência associados.....	19
Figura 3: Patogenicidade de <i>Salmonella spp.</i>	20
Figura 4: Etapa de preparo de material histológico para estereologia.....	27
Figura 5: Sistemas teste de contagem contendo pontos e linhas sobrepostos a diagramas de parte do intestino.....	28
Figura 6: Seleção de sorovar de <i>Salmonella enterica</i> para modelo experimental.....	30
Figura 7: Teste de concentração bacteriana invasiva.....	31
Figura 8: Modelo de co-infecção malária- <i>Salmonella</i> preestabelecido.....	31
Figura 9: Média de massa corpórea dos camundongos infectados ao longo dos oito dias de análise de infecção.....	32
Figura 10: Dosagem de citocinas e quimiocinas nos dias D2, D4 e D8 no modelo de co-infecção.....	33
Figura 11: Número total de células analisadas microscopicamente nos camundongos co-infectados e demais controles.....	34
Figura 12: Número de células diferenciadas a partir de precursores medulares.....	34
Figura 13: Número total de células bacterianas internalizadas nas subpopulações medulares.....	35
Figura 14: Crescimento de parasitemia (%) em ambos os grupos PB e CO.....	36
Figura 15: Comparação da capacidade invasiva de bactérias pré-inóculo e obtidas <i>ex vivo</i>	36
Figura 16: Irregularidades no intestino delgado de camundongos BALB/c causadas pela co-infecção malária- <i>Salmonella</i>	37
Figura 17: Quantificação de camadas do intestino delgado causadas pela coinfeção malária-salmonela.....	39

Figura 18: Quantificação de irregularidades no intestino delgado causadas pela
coinfecção malária-salmonela.....40

LISTA DE ABESVIATURAS E SÍMBOLOS

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

CO: Grupo de camundongos co-infectados malária-salmonela

D0: Dia da infecção malárica

D1: Um dia pós-infecção malárica

D2: Dois dias pós-infecção malárica

D4: Quatro dias pós-infecção malárica

D8: Oito dias pós-infecção malárica

g: Grama

h: Horas

IFN: Interferon

IL: Interleucina

ILMD: Instituto Leônidas e Maria Deane

mL: Mililitro

OMS: Organização Mundial da Saúde

***P. berghei* ANKA:** *Plasmodium berghei* ANKA

PB: Grupo de camundongos mono-infectados por *P. berghei*

PBS: Phosphate-buffered saline

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate

PMN: Células polimorfonucleares

***S. Typhi*:** *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Typhi*

ST: Grupo de camundongos mono-infectados por *S. Typhi*

sv: Sorovar

TNF: Tumor Necrosis Factor

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1. Malária	15
2.2. <i>Salmonella</i>	17
2.3. Co-infecção malária-salmonela	20
2.4. Mecanismos descritos	21
2.5. Modelos experimentais	21
2.6. Interação patógeno-hospedeiro: intestinal e celular	22
3. Objetivos	23
3.1. Geral	23
3.2. Específicos	23
4. Métodos	23
• Cepas	23
• Animais	23
• Modelo de co-infecção de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA e <i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>Typhi</i>	24
• Estimativa da carga de bacteremia pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias	24
• Avaliação da atividade funcional	24
• Avaliação da presença de modulação bacteriana em ensaio de invasão bacteriana em células HeLa	24
• Análise de citocinas séricas	25
• Análise histopatológica do intestino	25
• Determinação do volume usando o método Cavalieri	25
• Densidade de volume usando o princípio Delesse	27
• Análises estatísticas	28
5. Resultados	29
5.1. Resultados prévios de seleção de sorovar <i>Salmonella enterica</i> para o desenvolvimento do modelo de coinfecção de malária	29
5.2. Perfil de citocinas durante a coinfecção por malária-salmonela em relação a mono-infecções por malária e salmonela	32
5.3. Avaliação da atividade fagocítica em subpopulações medulares	33
5.4. Avaliação da presença de modulação bacteriana	35

5.5. Análise histopatológica do intestino	37
6. Discussão	40
7. Conclusões	45
8. Referências Bibliográficas	46

1. Introdução

A malária é uma doença parasitária com impacto mundial, e ainda uma ameaça emergente, atingindo centenas de países no mundo. De acordo com as últimas estimativas da OMS, cerca de 228 milhões de casos ocorreram em 2018 e a doença causou 405 mil mortes estimadas, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade. *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* seguem como duas das principais espécies que afetam a população onde a malária é endêmica (WHO, 2020). Concomitantemente, bactérias do gênero *Salmonella* são uma das quatro principais causas de doenças diarreicas mundiais, e suas infecções são também uma das maiores causas de morbidade e mortalidade principalmente em crianças abaixo de 5 anos e adultos imunocomprometidos (WHO, 2020). A malária está entre os fatores de risco para bacteremia por *Salmonella*, isto é sugerido, possivelmente, devido à distribuição geográfica sobreposta destes patógenos, uma vez que em regiões com endemia de malária, há um aumento de bacteremia por *Salmonella* durante a estação chuvosa (alta transmissão malárica), o que indica influência nessa sazonalidade assim como a escassez de saneamento básico (TAKEM, 2014). Todas as salmonelas podem causar infecções extra intestinais, mas *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis* e *S. dublin* são os principais sorotipos que causam salmonelose invasiva em humanos (BRONZAN et al, 2019; BESSER, 2017; LIN-HUI SU et al, 2007).

Registros que indicam que a malária pode influenciar e desenvolver uma suscetibilidade à bacteremia por *Salmonella* existem desde o início do século passado (GEORGE GIGLIOGI, 1929), e essa forte associação é documentada em dados epidemiológicos em vários países africanos até os tempos atuais, como Malawi e Gâmbia (FEASEY et al 2012; BRONZAN et al 2007; MABEY et al 1987). Embora a ocorrência de bacteremia por *Salmonella spp* em pacientes com malária esteja bem documentada, os mecanismos imunológicos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro ainda são escassos. Alguns deles foram mostrados de forma convincente envolvendo basicamente a resposta imune humoral, na supressão de anticorpos, a disfunção de neutrófilos e macrófagos, e a disfunção da barreira de mucosa (TAKEM, 2014).

A malária é relatada como um possível supressor de resposta de anticorpos heterólogos, o que sugere a supressão de resposta humoral contra *Salmonella* (CUNNINGTON, 2010). Também é associada ao desarranjo anatômico (alterações morfológicas) do baço, atingindo principalmente linfócitos B de zonas marginais (MZ), e, conseqüentemente, reduz a sua atividade de eliminação de bactérias (GÓMEZ-PÉREZ et al,

2014). Estudos pioneiros já associavam a disfunção da atividade dos macrófagos como um importante papel no aumento da suscetibilidade a bacteremia por *Salmonella* (MABEY, 1987), uma vez que estas células são um dos principais fagócitos de bactérias. É sugerido que uma disfunção ocorre devido a redução da produção de IL-12 (ROUX et al, 2010), uma citocina importante na resposta imune inata a micro-organismos intracelulares. A hemólise causada pelo *Plasmodium* libera heme no organismo, derivado de hemoglobina. Com o aumento da concentração de heme, sua enzima degradadora, heme oxigenase 1 (HO-1) é secretada e degrada heme em biliverdina, monóxido de carbono e ferro. A liberação de ferro é capaz de gerar estresse oxidativo, o que impacta positivamente o crescimento de *Salmonella*, uma vez que o utiliza como fonte de nutriente, assim como outras bactérias intracelulares (VAN SANTEN et al, 2013).

Outro mecanismo fisiopatológico em favor dessa suscetibilidade se baseia em estudos com malária grave por *P. falciparum*. A resposta inflamatória do intenso sequestro de eritrócitos parasitados no endotélio da microvasculatura dos tecidos causa uma disfunção endotelial, e conseqüentemente afeta seu funcionamento (WASSMER, 2017), aumentando a permeabilidade intestinal às invasões de bactérias entéricas, dentre elas o gênero *Salmonella* (HALDAR, 2007).

Estudos que abrangem análises histopatológicas focam majoritariamente em tecido cerebral na malária cerebral, baço em razão da disfunção da resposta imune (GÓMEZ-PÉREZ, 2014), e dano hepático (PATEL et al, 2018). Os mais recentes que envolvem função celular, focam na função de mastócitos (PATEL et al, 2018; POTTS et al, 2016). Por outro lado, os que abordam prioritariamente a barreira de mucosa intestinal com análises histopatológicas são escassos, e os estudos clínicos que abordam permeabilidade intestinal são obsoletos, como o realizado em pacientes com malária falciparum dosando taxas de substâncias como sacarose, lactulose e manitol na urina como indicativos de alteração desta permeabilidade (WILAIRATANA, 1997).

A carência de informações em torno da permeabilidade intestinal num contexto de uma infecção malárica pode ser sanada com desenvolvimento de modelos experimentais de co-infecção com sorovares de *Salmonella*. Assim, este estudo pretende desenvolver um modelo de co-infecção malária e *Salmonella*, utilizando a cepa *Plasmodium berghei* ANKA e o sorovar *Salmonella enterica Typhi*. Com o estabelecimento do modelo, a atividade funcional de macrófagos e neutrófilos obtidas de tecidos (medular) e as análises histopatológicas da mucosa intestinal podem expandir a compreensão da base imunológica

acerca da suscetibilidade à septicemia durante a malária aguda ou após a convalescência, auxiliando na determinação de fatores relacionados a complicações observadas em casos clínicos de crianças e adultos imunocomprometidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Malária

A malária é uma doença parasitária de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do globo, atualmente em 89 países espalhados pela África, América do Sul e Central, Índia, Sudeste Asiático e Oceania, e segundo as últimas estimativas da OMS, cerca de 228 milhões de casos ocorreram em 2018 e a doença causou 405 mil mortes estimadas, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (World Malaria Report, WHO, 2020). Ocorre principalmente através do seu vetor de transmissão, mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*.

Cerca de 25 das mais de 400 espécies de anofelinos são bons vetores do *Plasmodium spp*, devido características de reprodução e adaptação em climas tropicais e subtropicais, e a preferência do repasto por sangue humano (WHITE et al, 2013; WHO, 2019). Cinco espécies de *Plasmodium* causam doença em humanos: *P. malarie*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as duas últimas as principais espécies que afetam a população a nível mundial. No geral, o ciclo de vida do *Plasmodium* possui duas fases: ciclo esporogônico (sexuado), que ocorre no vetor, e o ciclo esquizogônico (assexuado), que contém a fase pré-eritrocítica e eritrocítica, ambas ocorrem no hospedeiro (WHO, 2019).

No seu ciclo biológico (Figura 1), o parasita em forma de esporozoítos (infectante) presentes na saliva de mosquitos fêmeas anofelinas são regurgitados em seu ato hematofágico para ovoposição. Após a picada, no hospedeiro, os esporozoítos percorrem a derme e migram para células hepáticas através da corrente sanguínea, onde inicia seu processo de replicação intracelular assexuada (fase pré-eritrocítica) dentro de estrutura denominada vacúolo parasitóforo, para a formação final de merozoítos. Até este estágio, o hospedeiro apresenta um quadro assintomático e não infeccioso. Após a ruptura do esquizonte – forma multinucleada formada pelo crescimento e multiplicação de esporozoítos que previamente se transformaram em criptozoítos nos hepatócitos – as células do fígado também são rompidas liberando merozoítos. Estes migram para eritrócitos na corrente sanguínea, dando início à fase eritrocítica. Cada merozoíto liberado de um hepatócito, infecta um eritrócito (BASU, 2017).

No interior da célula, o merozoíto realiza esquizogonia novamente e evolui para trofozoíto. O núcleo do trofozoíto se replica, de forma assexuada e resulta em esquizonte, que

se rompe liberando mais merozoítos. A partir deste estágio, o quadro febril e demais sintomas podem surgir. Durante a fase de esquizogonia eritrocítica, parte destes merozoítos liberados dão início ao processo sexuado, onde se transformam em gametócitos masculinos (microgameta) e femininos (macrogameta), tornando o hospedeiro infectante. Quando fêmeas do mosquito anofelino pica este hospedeiro infectado, ingerem gametócitos presentes na sua circulação periférica, e no seu intestino será iniciado o ciclo esporogônico. No intestino do

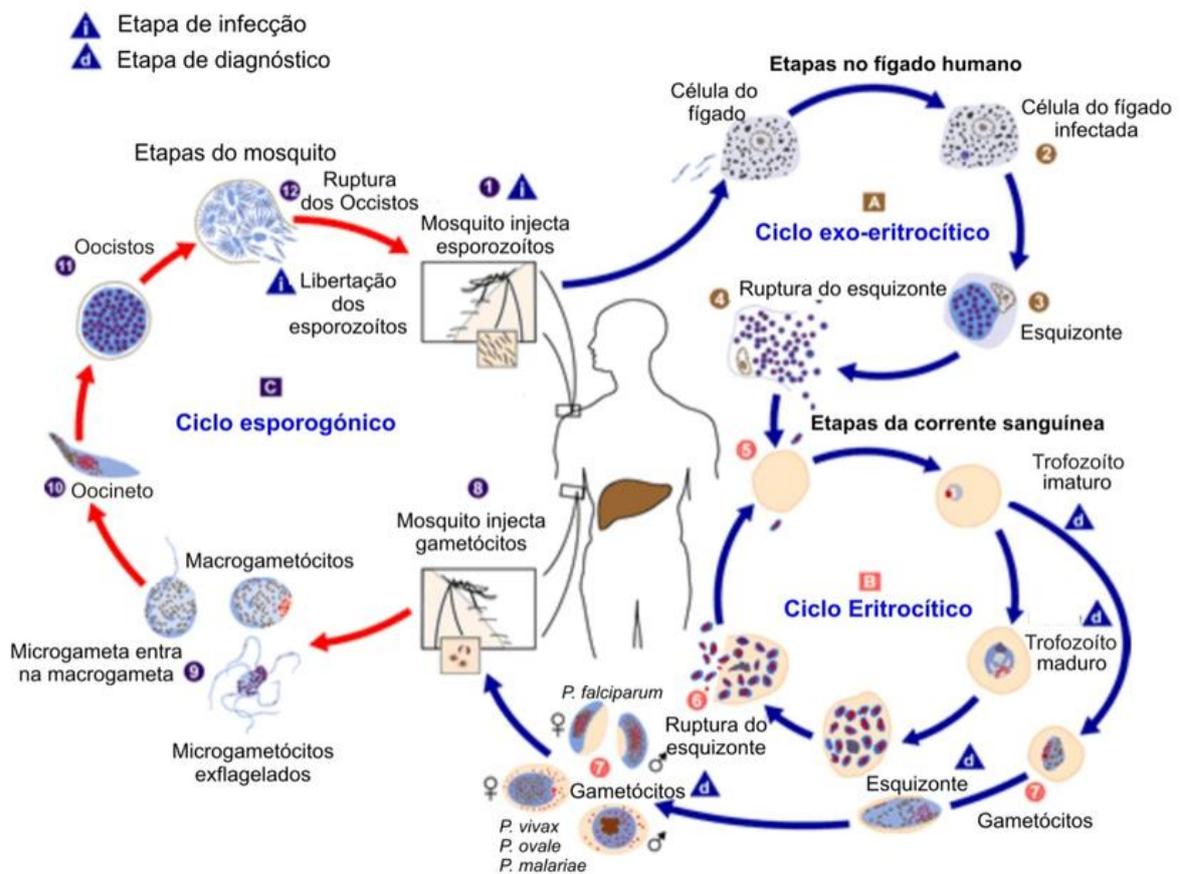


Figura 1 Ciclo biológico de Plasmodium spp. Fonte: Center for Disease Control.

mosquito, os gametas fecundam formando o oocineta, que se desenvolve em oocisto e gera os esporozoítos. Estes, após ruptura do oocisto, migram para as glândulas salivares do mosquito, onde ficam armazenados a espera de uma próxima picada, e assim, reiniciam seu ciclo biológico (BASU, 2017; WHO, 2019).

Os sintomas clínicos de um indivíduo com malária são, inicialmente, inespecíficos, frequentemente inclui ausência de bem-estar, dor de cabeça, fadiga, dores musculares e desconforto abdominal, acompanhado de febre irregular. A maioria dos pacientes com infecções não complicadas apresentam principalmente quadro febril, anemia leve e, após vários dias, baço palpável. Manifestações de malária falciparum grave dependem da idade. O

tratamento completo erradica a infecção, e qualquer retorno dos sintomas sugere tratamento incompleto (baixa adesão de tratamento), resistência parasitária aos medicamentos utilizados ou nova infecção. Esta última, ocorre principalmente com indivíduos que residem áreas endêmicas. Anemia grave e hipoglicemia são mais comuns em crianças, enquanto edema pulmonar agudo, lesão renal aguda e icterícia são mais comuns em adultos; coma (malária cerebral) e acidose ocorrem em todas as faixas etárias. A mortalidade aumenta quando a proporção de eritrócitos infectados (parasitemia) excede 2%, embora a relação entre a densidade do parasita e o prognóstico na malária seja muito variável.

Quando tratada prontamente com antimaláricos eficazes, a malária falciparum (considerada mais grave) não complicada tem uma mortalidade de aproximadamente 0,1%. No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, as infecções subsequentes podem ocorrer em intervalos, como resultado da reativação do estágio de hipnozoíto residente no fígado, isto é, formas dormentes originadas de esporozoítos que podem se reativar, resultando no termo conhecido como recaída, típica da infecção destas duas espécies (WHITE et al, 2013; COWMAN et al, 2016; BASU 2017).

Em resumo, as infecções maláricas podem ser assintomáticas, com sintomas leves ou graves, ou fatais, dependendo de muitos fatores, como a virulência do parasita e o estado imunológico do hospedeiro. Embora a letalidade da malária atualmente seja menos de 1% em todo o planeta, isto significa mais de 400 mil mortes em apenas um ano, atenções ainda são necessárias também devido ao comprometimento da resposta imune do hospedeiro contra outros patógenos, a exemplo, a *Salmonella sp.*

2.2. *Salmonella*

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, são bacilos gram-negativas, não esporuladas, não capsuladas, a maioria das espécies possuem motilidade positiva, não fermentam lactose, são intracelular facultativa e anaeróbica facultativa. Estão entre as causas de doenças mais alarmantes para a saúde pública em todo o mundo, com aproximadamente 20 milhões de novos casos e mais de 200.000 mortes anualmente, afetando principalmente crianças abaixo de cinco anos e adultos imunocomprometidos nos países subdesenvolvidos, cujo saneamento básico é precário, e onde mais houver má manipulação de água e alimentos contaminados (WHO, 2020; DEKKER & FRANK, 2015).

Apesar de seu reconhecimento como um importante patógeno, o sistema de nomenclatura de *Salmonella* ainda causa controvérsias devido ao gênero ser extremamente

heterogêneo (LIN-HUI SU et al, 2007). Atualmente, os sistema define o gênero composto por três espécies: *S. subterranea*, *S. bongori* e *S. enterica*, esta última possuindo mais de dois mil sorotipos e classificada como subespécie. A mais conhecida é *S. enterica* subespécie *enterica* predominantemente associada a aves (principal via de transmissão) e mamíferos (principal reservatório). Esta subespécie é ainda classificada em serovares, com base nos antígenos O (lipopolissacarídeo) e H (flagelar) (JOHNSON et al, 2018; BRENNER et al, 2000) A capacidade dos diferentes sorotipos de *Salmonella* de sobreviver e se multiplicar em diferentes ambientes dos hospedeiros envolve vários fatores interconectados, incluindo diferenças de ambiente (pH, temperatura, locais de fixação, etc.), sistema imunológico do hospedeiro e sua resposta a diferentes sorotipos, organismos comensais presentes e a genética do próprio patógeno (FOLEY et al, 2013). Dentre as de maior importância para a saúde humana, destacam-se a *Salmonella Typhi* (*Salmonella enterica enterica* sorovar *Typhi*), por causar infecções sistêmicas, mais conhecida como febre tifoide, e ser endêmica em muitos países em desenvolvimento, e as não tifoide (NTS), principais agentes causadores das gastroenterites – inflamação que afeta somente o trato gastrointestinal (WHO, 2019).

A principal via de infecção em humanos e animais é através da transmissão fecal-oral de *Salmonella*. Seu mecanismo de patogenicidade inclui etapas de adesão, invasão, replicação, resistência aos mecanismos de defesa e dano ao hospedeiro (Figura 2). Inicialmente, é preciso que ela sobreviva na extrema acidez estomacal, respondendo ao ambiente ácido por meio de um complexo sistema adaptativo, chamado de resposta de tolerância a acidez (BEARSON, 2006). As células bacterianas que sobrevivem ao ambiente com pH baixo são mantidas no lúmen dos órgãos do trato gastrointestinal. Lá, elas competem com a microbiota comensal e fazem reconhecimento dos receptores na superfície da célula alvo (células epiteliais e células M) por meio de adesinas (no caso de *Salmonella*, principalmente fímbrias e flagelos presentes na sua superfície celular) na etapa de adesão (FOLEY et al, 2013; STEVENS et al, 2009).

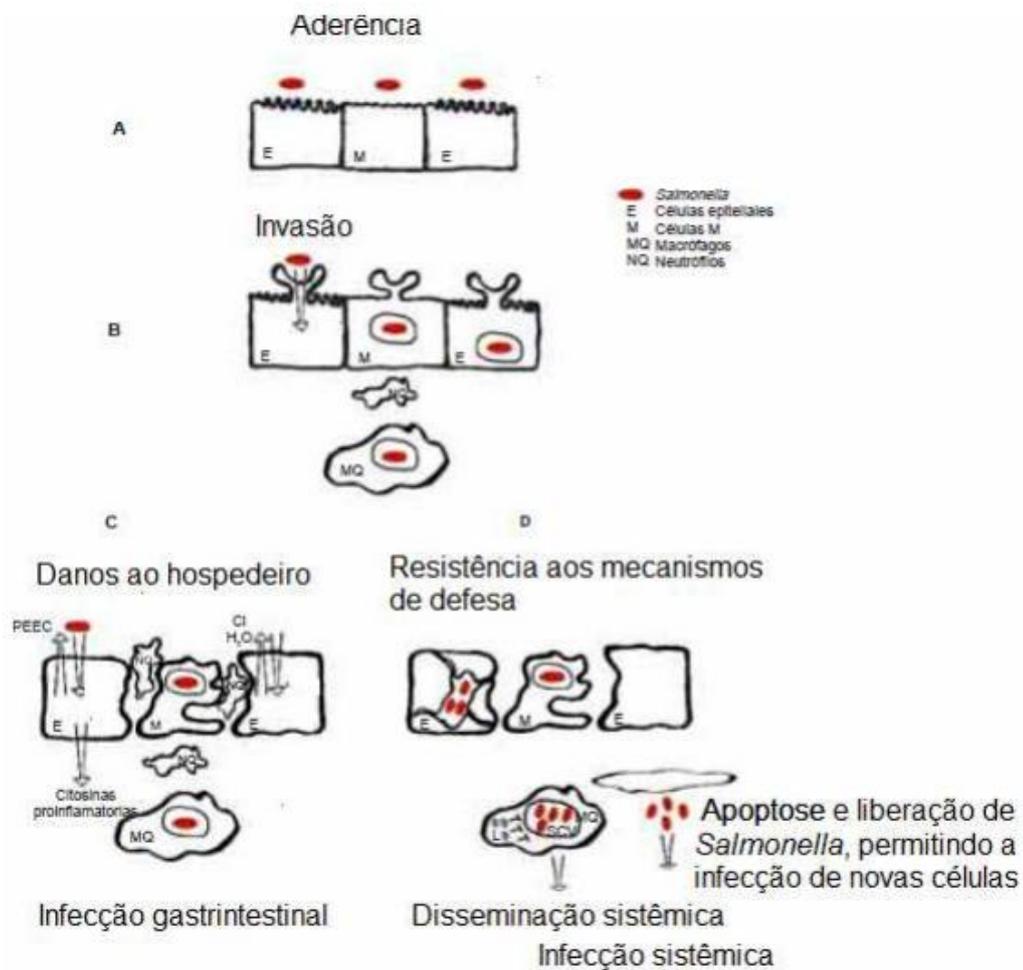


Figura 2 Modelo de eventos na patogênese da infecção por *Salmonella* e genes de virulência associados. (A) Etapa de aderência, (B) e (C) etapa de invasão com dano à camada epitelial do intestino do hospedeiro e disseminação sistêmica (septicemia). Fonte: OCHOA & RODRIGUES (2005)

A interação *Salmonella*-célula hospedeira é desencadeada pela ativação direta de componentes bacterianos, e indiretamente, por meio de efeito citotóxico sobre as células do hospedeiro por diferentes fatores, incluindo citocinas. Na etapa de invasão, a *Salmonella* modifica a parede da célula hospedeira para conseguir se internalizar. *Salmonella* envia sinais às células epiteliaes que induzem alteração do citoesqueleto, promovendo um aspecto franzido ou pregueado (ruffling), que resulta na endocitose da bactéria no interior da vesícula fagossoma. A resposta induzida pela bactéria produz efeitos citotóxicos que resultam na destruição das células M e invasão de enterócitos adjacentes. Nesta etapa de quadro inflamatório, há aumento na secreção de cloro e água, que causa diarreia (Figura 3). Além das lesões e sinais relacionados ao trato gastrintestinal, também induz apoptose de macrófagos ativado e fagocitose induzida em macrófagos não ativado, sendo então transportado para o fígado e o baço, dando início a infecção sistêmica (FOLEY et al, 2013; VELGE et al, 2012).

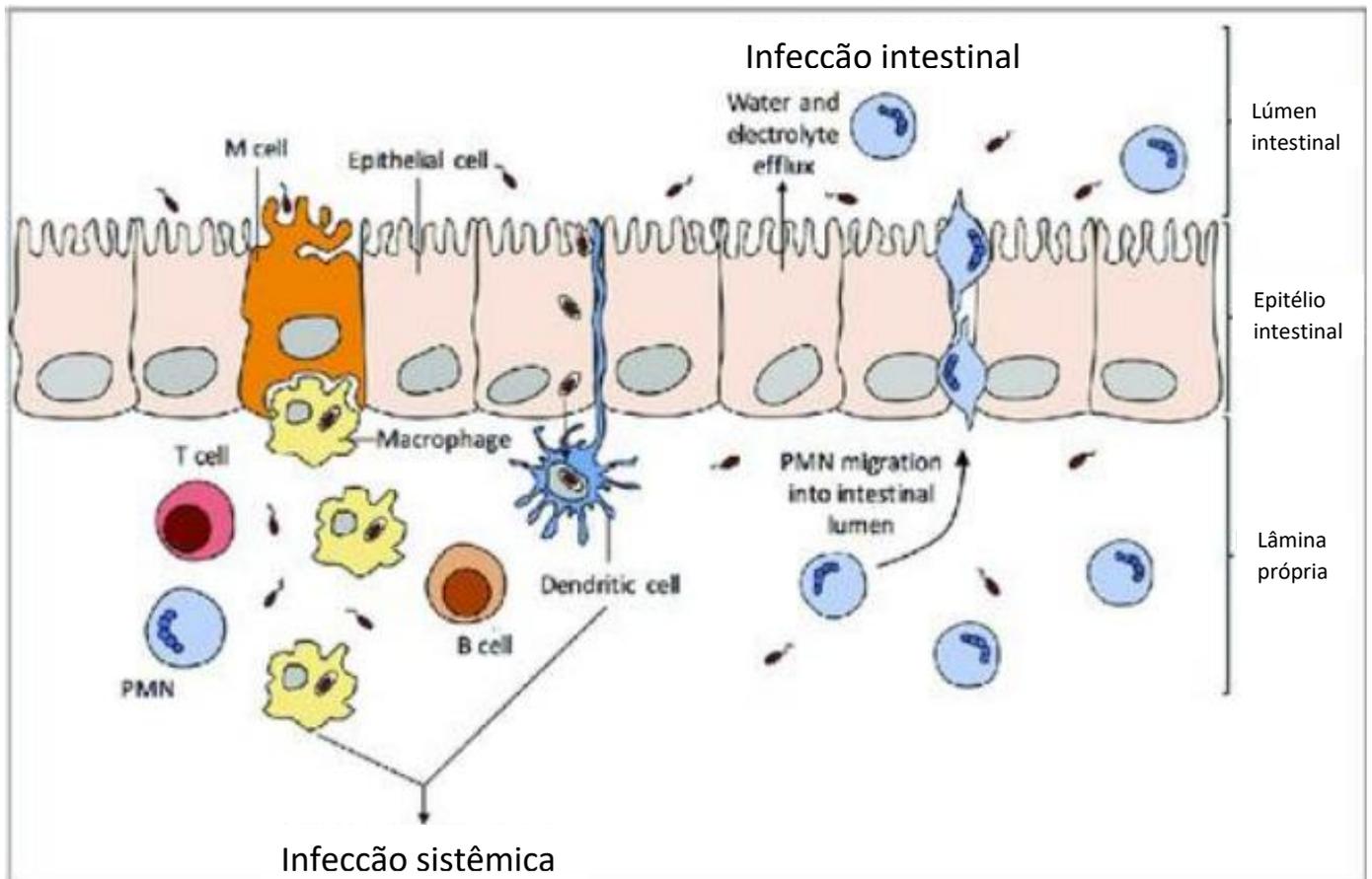


Figura 3 Patogenicidade de *Salmonella* sp. Etapa de invasão, gerando resposta inflamatória, migração de células imunológicas à camada epitelial do intestino delgado e fagocitose. Fonte: dado não encontrado.

A associação entre malária e infecções bacterianas tem sido descrita há quase um século (GEORGE GIGLIOGI, 1929), e nos últimos anos ganhou destaque devido a sobreposição de ambas em termos de distribuição geográfica (TAKEM, 2014). Parte das evidências epidemiológicas mostraram que a diminuição da incidência de bacteremia por *Salmonella* ocorre simultaneamente à diminuição de malária severa (MTOVE et al, 2011; MACKENZIE et al, 2010). Ademais, estudos clínicos mostraram uma maior prevalência de casos de crianças com malária e bacteremia por *Salmonella*, comparado a outras infecções (BIGGS et al, 2014; VANDENBERG et al, 2010). E ainda, uma maior prevalência de crianças com bacteremia por *Salmonella* entre crianças hospitalizadas com malária (NADJM et al, 2010; BERKLEY et al, 2009; MABEY, 1987).

Os principais registros da ocorrência deste tipo de co-infecção estão instalados na África Subsaariana. O acúmulo de registros epidemiológicos suporta a associação da malária como um fator de suscetibilidade à infecção e bacteremia por *Salmonella*, apesar das características clínicas e consequências da co-infecção ainda não estarem bem definidas,

mesmo com mortalidade associada à ela ser mais elevada quando comparada à mono-infecção de malária (TAKEM, 2014), o que sugere um quadro subestimado. Alguns mecanismos que explicam esta patogenia já foram propostos.

2.4. Mecanismos descritos

Os mecanismos imunológicos propostos sugerem que a hemólise causada pela malária aumenta a produção da heme-oxigenase e o estresse oxidativo, ocasionando resposta inflamatória da mucosa e deficiência na função de fagócitos e outras células. Esses efeitos reduzem a resistência ao patógeno e alteram a permeabilidade intestinal com dano tecidual (PATEL et al, 2018; POTTS et al, 2016; MOONEY et al, 2015; MOONEY et al, 2014; CHAU et al, 2013; CUNNINGTON et al, 2012). Entretanto, ainda há uma carência de informações sobre a atividade funcional de neutrófilos e macrófagos contra sorovares de *Salmonella* na presença prévia e contínua de uma infecção malárica. Uma melhor abordagem e conhecimento da interação dos mecanismos imunológicos efetores do hospedeiro, para controle e eliminação bacteriana que geram comorbidades na população afetada é absolutamente essencial (NYIRENDA et al, 2018). Ainda há, na literatura, uma carência de informações quantitativas do trato intestinal na condição de co-infecção malária-*Salmonella*.

2.5. Modelos experimentais

Além dos estudos das principais espécies que infectam humanos, modelos animais fazem parte de pesquisas em malária, que incluem principalmente infecções de primatas não humanos, roedores (*P. berghei* ANKA em *Mus musculus*) e aves (SU et al, 2019). A infecção bacteriana por *Salmonella* é estudada principalmente em modelo murino, mas também existem cepas que infectam aves e porcos (KNODLER et al, 2020; JOHNSON et al, 2018; HOLT et al, 2009). Estudos experimentais em camundongos, especificamente, são encontrados principalmente utilizando o sorovar *Typhimurium*, que tem efeito letal a longo prazo em camundongos, porém uma limitação é encontrada pois há diferenças genéticas e de resposta do hospedeiro quando comparado com o sorovar tifoide *Typhi* em humanos, visto que neste último, a *S. Typhimurium* causa apenas uma gastroenterite e não febre tifoide (JOHNSON et al, 2018; TSOLIS et al, 2011; HOLT et al, 2009). Modelos animais alternativos vêm sendo mais buscados desde o final dos anos 1990 e na primeira década do século XXI (TSOLIS et al, 2011). A utilização de novas abordagens de infecção utilizando *S. Typhi* em camundongos é uma promessa para explorar ainda melhor a patogênese destes sorovares tifoídes.

Investigações de patogênese em roedores ou outros modelos animais sob condições laboratoriais controladas, combinadas com a genética e genômica do parasita, podem fornecer informações pertinentes para compreensão e controle de doenças em humanos.

2.6. Interação patógeno-hospedeiro: intestinal e celular

Histologicamente, a parede do intestino consiste em quatro camadas separadas: (I) mucosa, que contém: epitélio (uma única camada celular que constitui o revestimento luminal das criptas intestinais), lâmina própria (tecido conjuntivo rico em células) e a muscular da mucosa (uma fina camada muscular circular); (II) submucosa, que consiste principalmente de fibrilas de colágeno em uma matriz de substância fundamental de mucopolissacarídeo; (III) muscular própria, com um componente muscular circular interno e um componente muscular longitudinal externo; e (IV) serosa, que é a camada peritoneal externa muito fina. Dados morfométricos de estereologia deste tipo de tecido são consideráveis fontes de informação (NYENGAARD & ALWASEL, 2014).

Evidências afirmam que a infecção por *Plasmodium* compromete o microbioma intestinal e conseqüentemente sua homeostase, que pode interferir diretamente na barreira de proteção física e química contra a bacteremia por *Salmonella*, tornando o hospedeiro mais suscetível à colonização da mesma (TANIGUCHI et al, 2015; MOONEY et al, 2015).

A invasão de *Salmonella* através da mucosa intestinal pode ocorrer por meio de sua captação pelas células dendríticas que expõem dendritos entre enterócitos para o lúmen intestinal, por meio da invasão direta de enterócitos, ou pela passagem pelas células M das placas de Peyers, e para que isto ocorra é necessário um quadro inflamatório. A invasão bacteriana desencadeia a secreção de IL-23/IL-18 que leva à ativação de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias (como IFN γ e TNF α) e quimiocinas, eventualmente resultando em edema e infiltração de monócitos e neutrófilos na lâmina própria e na camada epitelial (MOONEY et al, 2019; VELGE et al, 2012; WINTER et al, 2010; GODINEZ et al, 2008; CHEMINAY et al, 2004).

Os neutrófilos, também chamados de células polimorfonucleares (PMNs), são leucócitos diferenciados terminalmente com núcleos lobulados distintos e contêm grânulos citoplasmáticos antimicrobianos. São responsáveis, assim como macrófagos, por gerar estresse oxidativo, indispensáveis na eliminação de patógenos bacterianos (MOONEY et al,

2019; KRUGER et al, 2015), mas podem ser totalmente comprometidos na presença de uma infecção por *Plasmodium*.

Estudos que sugerem falha de atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos como um fator de suscetibilidade são baseados principalmente em estudos clínicos. A disponibilidade de cultivo *ex vivo* de fagócitos pode confirmar *in vitro* sua atividade disfuncional como fator de suscetibilidade causada pela malária. Tais células obtidas de medula de fêmur e de baço poderão contribuir na confirmação dos dados observados nestes estudos clínicos.

3. Objetivos

3.1. Geral

Estabelecer modelo de co-infecção malária e *Salmonella* em camundongos BALB/c, avaliando alterações da mucosa intestinal e suscetibilidade.

3.2. Específicos

- Comparar se a suscetibilidade a bacteremia nos co-infectados está associada atividade disfuncional de fagócitos em modelo experimental *ex vivo*.
- Analisar as alterações histopatológicas do tecido intestinal nos camundongos co-infectados com malária e *Salmonella*.

4. Métodos

- **Cepas:** A cepa de *Plasmodium berghei*-ANKA foi cedida pelo Dr. Cláudio Marinho, do Laboratório de Imunoparasitologia Experimental da Universidade de São Paulo – USP. A cepa de *Salmonella Typhi* foi cedida pela Dra. Patrícia Orlandi, do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia.
- **Animais:** Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem BALB/C com idade entre 6 e 8 semanas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA do Instituto de Pesquisa da Amazônia – INPA, sob o número de processo 2018016, para garantir que todo trabalho com modelo animal proposto obedeça às diretrizes preconizadas pela Lei 11.794/2008, que regulamente e estabelece os procedimentos para

uso de animais para fins científicos. Em todos os experimentos, o bem-estar dos animais foi levado em consideração. Os camundongos foram alojados em uma gaiola de policarbonato padrão com cama de aparas de madeira, com um máximo de 5 camundongos por gaiola. O biotério estava sob temperatura e umidade controladas em um ciclo claro e escuro de 12 h. Todos os camundongos utilizados tiveram acesso *ad libitum* a comida e água.

- **Modelo de co-infecção de *Plasmodium berghei* ANKA e *Salmonella enterica* sorovar *Typhi*:** Os animais foram submetidos à infecção malária via intraperitoneal de 100 µL contendo 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA no D0, seguido de infecção via gavagem de 100 µL de *S. Typhi* 1×10^3 em caldo LB 24h, no dia seguinte a infecção malárica (D1). A extração do intestino ocorreu três e sete dias (D4 e D8) após a infecção malárica.
- **Estimativa da carga de bacteremia pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias:** Uma porção do intestino e do fígado foi macerado e homogeneizado com solução
- salina PBS na concentração 100µg/mL. Para a quantificação da carga bacteriana, o homogeneizado foi semeado em meio de cultura Salmonela Shigella (SS Ágar), e incubado a 37 °C. Após 24 horas as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas.
- **Avaliação da atividade funcional:** A atividade fagocitária de neutrófilos e macrófagos foi avaliada por cultura celular após tempo de incubação baseado na literatura e otimizado para tal metodologia. Após a indução da anestesia e analgesia, os camundongos foram eutanasiados para a retirada de subpopulações medulares do fêmur. As células mononucleares foram recuperadas e colocadas em cultivo celular em placas contendo lamínulas de vidro e meio de cultura DMEM/F-12. Após a incubação *ex vivo* por 24 horas, as células aderentes foram incubadas com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) para ativação no ensaio de fagocitose. Uma suspensão de *Salmonella Typhi* mortas por formalização foram incubadas com as células aderentes. Por fim, as lâminas foram lavadas, fixadas em ácido pícrico e coradas pelo método de Romanowsky. Neutrófilos e monócitos foram visualizados por meio de características de coloração e o número total de bactérias fagocíticas foi calculado.
- **Avaliação da presença de modulação bacteriana em ensaio de invasão bacteriana em células HeLa:** Foi analisado a possibilidade da cepa de salmonela utilizada sofrer

modulação bacteriana pós-infecção e influenciar a atividade fagocitária. Para isso, os fígados dos camundongos que foram co-infectados no D4 foram macerados e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para efeito de comparação, uma alíquota de *S. Typhi* foi utilizada nas mesmas condições do pré-inóculo (na fase de crescimento de nove horas em caldo LB) e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 dias até o momento do ensaio. Células HeLa foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lâminas de vidro (Knittel, Brasil) em meio RPMI (Sigma, Brasil) a 5% CO₂ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a confluência total. As duas bactérias, *ex vivo* e pré-inóculo, foram descongeladas e preparadas para o ensaio de invasão em células HeLa. As bactérias pré-inóculo foram diluídas em uma série de 10-10 e semeadas em meio SS-Agar para definir a equivalência do inóculo das bactérias *ex vivo*. O tempo de invasão foi de uma, três e seis horas. Após esses períodos, meio suplementado com gentamicina foi adicionado ao meio de cultura por uma hora para a eliminação de bactérias externas. As lâminas foram então lavadas, coradas com coloração de Romanowsky e as bactérias foram visualizadas.

- **Análise de citocinas séricas:** O plasma de cinco camundongos foi coletado para determinação de citocinas (MCP-1, IL-6, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17A) utilizando o kit CBA/Becton Dickinson/USA. As citocinas foram medidas em D2, D4 e D8 para cada um dos grupos de infecção.
- **Análise histopatológica do intestino:** Após a eutanásia, os intestinos dos camundongos foram retirados e mantidos em formol tamponado por 48 horas à temperatura ambiente. As amostras foram processadas no Laboratório de Morfologia Quantitativa (LaMiq/UFAM). Para isso, os intestinos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol 70 e 96% (2 horas em cada concentração), pré-infiltrados em solução plástica de historesina 96% etanol + hidroxietil metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha) durante a noite e infiltrados em 100% resina. As amostras foram dispostas em moldes individuais de teflon Histobloc (Külzer-Heraues, Alemanha) fixados em resina plástica + solução de polimerização. Os moldes foram aquecidos em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a polimerização completa. A análise da integridade epitelial do intestino e as medidas morfométricas foram feitas por meio da estereologia do princípio de volume de Cavalieri e do princípio de Delesse, ambos operados pelo programa Imod (KREMER et al. 1996).
- **Determinação do volume usando o método Cavalieri:** Cada bloco contendo um intestino foi observado em um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha). Foi determinado o seu comprimento total (L) e este valor foi dividido por seis,

representando a distância entre os cortes que foram marcados no bloco para serem visualizados durante a microtomia (Figura 4). A microtomia foi realizada em um micrótomo (Leica RM 2145, Alemanha) e os cortes subsequentemente corados com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12 g; Na + borato, 0,5 g; H₂O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5 g; H₂O destilada, 100 mL). Os cortes foram dispostos em lâminas histológicas (Figura 4A) e fotografados em pequeno aumento (10x) em estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha). As imagens obtidas foram analisadas no programa Imod versão 4.7/módulo de estereologia (KREMER et al. 1996), onde sistemas de contagem contendo pontos foram sobrepostos às imagens (Figura 4C). Cada vez que os pontos coincidiam com a parede do intestino, eles eram contados. O volume total do intestino foi obtido de acordo com o princípio Cavalieri (HOWARD & REED 2005). Este princípio é baseado em análises matemáticas robustas, e sua aplicação é simples e extremamente eficiente. O volume do intestino foi calculado da seguinte forma: $V (mm^3) = \sum_{i=1}^m Pi \times T \times a/p$ (GUNDERSEN et al. 1988). Onde, V é o volume absoluto do intestino, $\sum_{i=1}^m Pi$ é o número total de pontos em cada seção, a/p é a área representada por cada ponto (41.607,84 μm^2), e T (5.000 μm) é a distância entre cada seção.

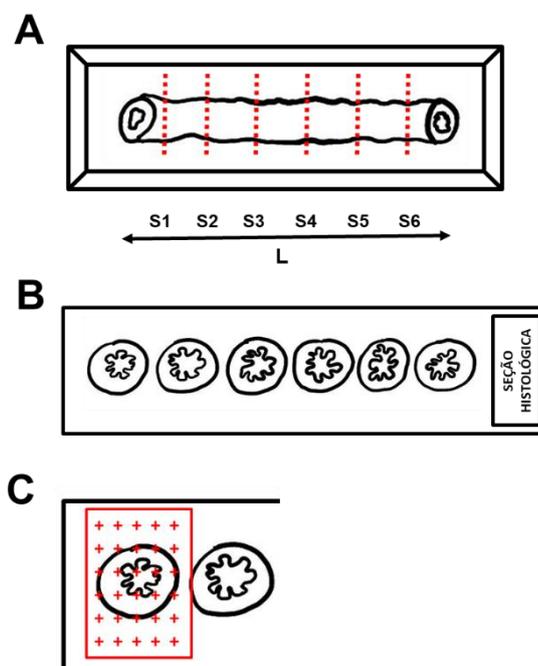


Figura 4 Etapa de preparo de material histológico para estereologia. **A.** Um intestino processado e incluído em resina plástica. As linhas tracejadas indicam a distância entre as seções seriais (S). **B.** Todas as seções (S) de um intestino foram dispostas em uma única lâmina microscópica. **C.** Cada seção foi fotografada em sua totalidade e sobre ela foi sobreposto um sistema de contagem contendo pontos para a determinação do volume de Cavalieri.

- Densidade de volume usando o princípio Delesse:** A porcentagem de cada componente na parede intestinal (células mucosas, mucosa, submucosa, muscular e camada serosa) foi obtida pelo princípio de Delesse (densidade de volume) (HOWARD & REED 2005). Para isso, um aumento de 200 (microscópio Leica DM 500, Suíça) foi empregado em campos de visão selecionados aleatoriamente (Figura 5). As imagens obtidas foram analisadas por meio do programa IMOD versão 4.7/módulo de estereologia (KREMER et al. 1996). Os componentes foram quantificados por contagem de pontos e o resultado expresso em porcentagem como: $Vv = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$ onde, Vv é o volume densidade (volume fracionário ou densidade relativa) de um componente particular do intestino; P_{comp} é a soma dos pontos que tocam a região de interesse (células da mucosa, camada mucosa, submucosa, camada muscular e serosa) e P_{ref} é a soma dos pontos que tocam o espaço de referência (toda a parede intestinal). Os dados percentuais (Vv) foram transformados em absolutos quando multiplicados pelo volume Cavalieri do intestino: $V_{absoluto} = VCavalieri \times Vv$ (GUNDERSEN et al. 1988).

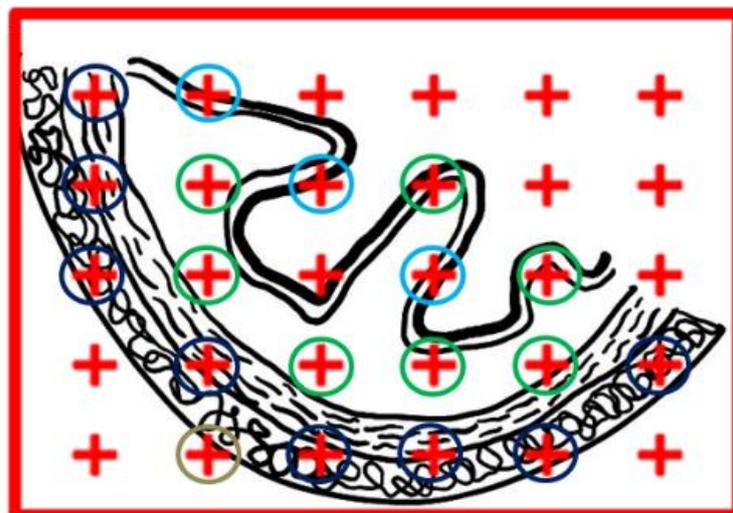


Figura 5 Sistemas teste de contagem contendo pontos e linhas sobrepostos a diagramas de parte do intestino. Sistema teste contendo cruzes para a estimativa da densidade de volume (Delesse). O ponto central da cruz é o referencial para a contagem que será computada sempre que o mesmo sobrepõe à camada mucosa (círculo azul claro), a camada submucosa (círculo verde), as camadas musculares (círculo azul escuro) e a camada serosa (círculo cinza).

- **Análises estatísticas:** O programa estatístico prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. USA) foi utilizado para a análise estatística e gráfica deste estudo. As variáveis independentes (tratamentos) foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Um teste ANOVA usando uma comparação de Tukey múltipla foi usado para os seguintes ensaios: 1) citocinas nos dias D4 e D8, 2) ensaios de fagocitose em D8 e 3) invasão *S. Typhi* do pré-inóculo e *ex vivo* em células HeLa. Em relação às análises histopatológicas, cortes seriados do intestino foram calculados por equações apropriadas desenvolvidas para análises estereológicas (GUNDERSEN et al. 1988, KREMER et al. 1996, HOWARD & REED 2005). Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% foram considerados aceitáveis. A estimativa do volume foi determinada de acordo com o princípio de Cavalieri, e os resultados foram analisados usando ANOVA de uma via.

$$CE = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{(\sum_{i=1}^m Pi)^{\frac{3}{2}}} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Onde: *CE* indica o coeficiente de erro para determinação do volume; $\frac{B}{\sqrt{A}}$, indica a variância das áreas transversais (coeficiente de forma) e depende da complexidade das formas da estrutura; *n* representa o número de seções avaliadas, e $\sum_{i=1}^m Pi$ é o número de pontos contados nas seções.

O *CE* de volume e densidade superficial foi estimado de acordo com a equação:

$$CE = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Onde: *CE* indica o coeficiente de erro para determinar a relação superfície / volume ou densidade / volume; *k* representa o número de imagens analisadas e *uev* são os totais de interseções ou pontos feitos. Um $CE \leq 10\%$ é considerado satisfatório (exato).

5. Resultados

5.1. Resultados prévios de seleção de sorovar *Salmonella enterica* para o desenvolvimento do modelo de coinfeção de malária

Para a seleção da cepa bacteriana a ser usada no modelo de coinfeção, três grupos contendo 4 camundongos BALB/c receberam 1×10^9 UFC *S. Typhi*, *S. Chloreaesius* ou *S. Salamae*, 100µl por indivíduo e por via oral (gavagem). Os animais não apresentaram alterações sistemáticas no período de 48h de infecção. Dois animais de cada grupo foram eutanasiados após 24h e os outros dois após 48h para retirada de fígado, baço e intestino delgado para a contagem de UFC. A invasão foi bem-sucedida com as três bactérias. Apenas o sorovar *Typhi* de *S. enterica* conseguiu evoluir na invasão, e aumentou o número de colônias estabelecidas em 48 h (Figura 6A). As *S. enterica* sorovar *Salamae* e *S. enterica* sorovar *Choleraesuis* apresentaram diminuição na quantidade de colônias entre 24 h e 48 h de infecção, demonstrando uma possível resposta imune no controle da invasão bacteriana (Figura 6B-C).

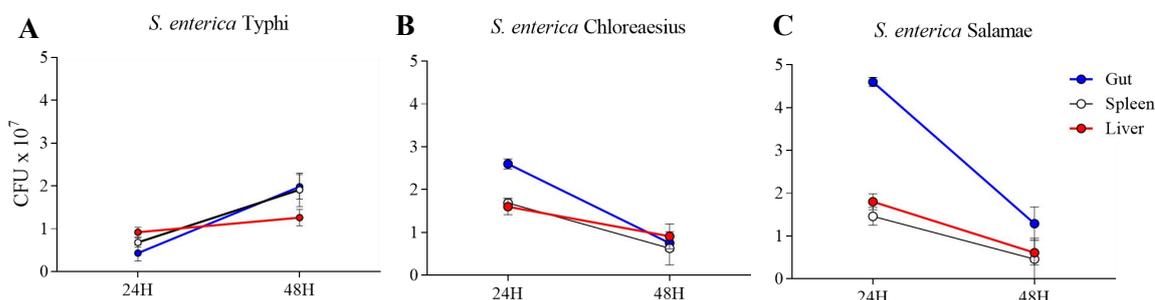


Figura 6 Seleção de sorovar de *Salmonella enterica* para modelo experimental. Para o desenvolvimento do modelo, três sorovares de *Salmonella enterica* foram empregados por meio de inoculação oral por gavagem na concentração de 1×10^9 UFC em 100µL. A quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de fígado macerado, baço e intestino de animais sacrificados 24h e 48h após o desafio é mostrada. Os homogeneizados foram semeados em ágar SS a 37 ° C para quantificação das UFC. (A) *S. Typhi*; (B) *S. Chloreaesius* e (C) *S. Salamae*.

No modelo de infecção malárica realizado, uma dose intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA no dia zero (D0) é capaz de levar camundongos BALB/a óbito por volta do dia 20 devido altas parasitemias (>60-70%). Os resultados preliminares do modelo de co-infecção proposto inicialmente permitiram determinar o inóculo de *S. enterica* sv *Typhi* no qual somente os animais previamente infectados com malária desenvolveram bacteremia. No entanto, a bacteremia foi transitória e não levou uma letalidade precoce nos animais co-infectados. Assim, uma nova estratégia foi realizada.

Suscetibilidade de camundongos com malária à infecção por *Salmonella enterica* sv *Typhi*

Com base na hipótese de que a infecção por malária atuaria como fator de suscetibilidade à invasão de *Salmonella*, o desenho experimental da coinfeção foi testado para definir a concentração bacteriana mínima em que a bacteremia ocorria apenas em camundongos previamente infectados com malária, e não em camundongos saudáveis.

Três grupos contendo quatro camundongos foram classificados como co-infectados e receberam uma dose intraperitoneal de 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA no dia 0 (D0). Um grupo recebeu uma dose de 1×10^5 UFC de *S. Typhi*, o segundo recebeu 1×10^4 UFC e o terceiro 1×10^3 UFC no D1, por gavagem. Para a comparação, três outros grupos contendo quatro camundongos foram classificados como mono-infecção por *S. Typhi*, e receberam por gavagem em D1, uma dose de 1×10^5 UFC, o segundo recebeu 1×10^4 UFC e o terceiro 1×10^3 UFC. O desenho experimental da coinfeção malária-salmonela foi avaliado pela presença e/ou ausência de unidades formadoras de colônias no macerado do fígado, baço e intestino de D2, D4 e D8 (Figura 7). A cultura bacteriana foi positiva em todas as placas das condições de coinfeção, em todos os dias amostrados (D2, D4 e D8), enquanto o grupo que foi mono-infectado com *S. enterica* sv *Typhi* infectado com 1×10^3 UFC não apresentou crescimento bacteriano em nenhum dos macerados órgãos em qualquer um dos dias analisados. Os resultados permitiram determinar que o inóculo de 1×10^3 UFC de *S. enterica* sv *Typhi* só foi capaz de desenvolver bacteremia em animais previamente infectados com malária. À partir disto, o modelo de co-infecção malária-salmonela foi definido (Figura 8).

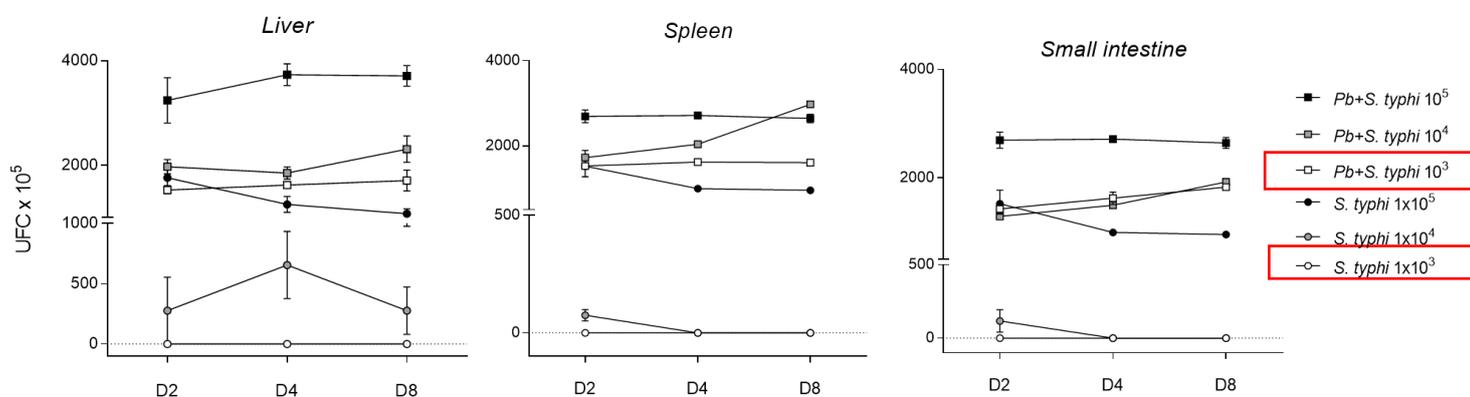


Figura 7 Teste de concentração bacteriana invasiva. No grupo co-infectado, a UFC foi presente nos órgãos em todas as concentrações bacterianas, dos três dias analisados. Entretanto, no grupo de mono-infecção por *Salmonella*, a UFC foi parcialmente presente na concentração de 1×10^4 e completamente ausente na concentração de 1×10^3 , sendo esta a concentração escolhida para a indicação da malária como fator de suscetibilidade.

O modelo de co-infecção foi então estabelecido (Figura 8) com base também na avaliação da massa corpórea dos camundongos (Figura 9) no decorrer dos dias de coleta. Foi

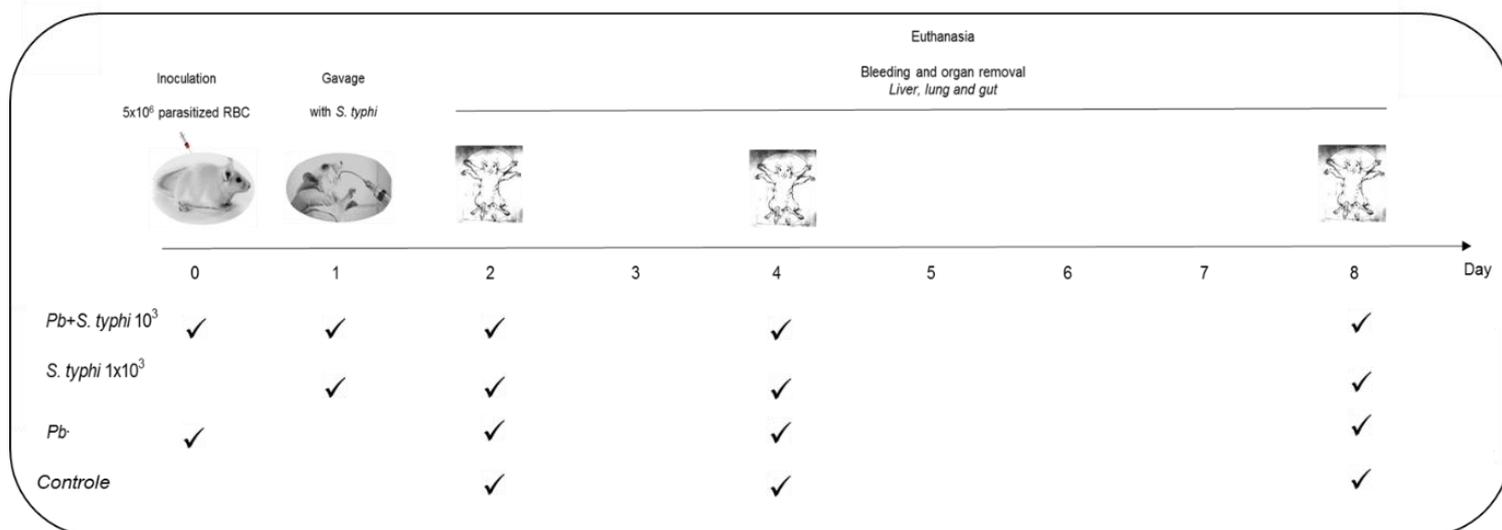


Figura 8 Modelo de co-infecção malária-salmonela preestabelecido. Foi encontrada a concentração mínima bacteriana ideal que gera bacteremia no camundongo previamente infectado com malária, enquanto isso não acontece na infecção isolada por Salmonella. Controles: Branco, *Pb*: mono-infecção *P. berghei*, *S. typhi*: mono-infecção por *S. typhi*.

possível observar perda de massa significativa no grupo co-infectado em relação ao grupo mono-infectado ST no D8.

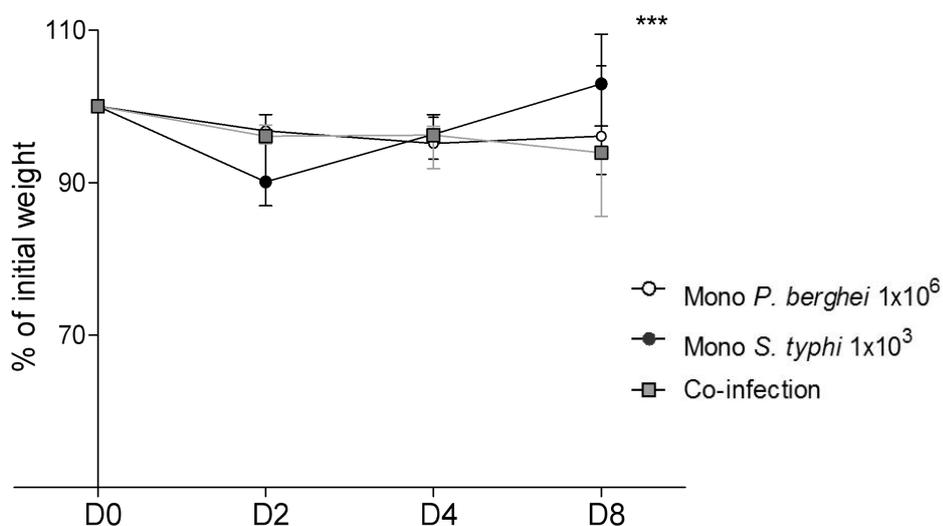


Figura 9 Média de massa corpórea dos camundongos infectados ao longo dos oito dias de análise de infecção. Condições: mono-infectado malária; mono-infectado Salmonella; co-infectado. É possível observar a queda contínua de peso dos camundongos do grupo co-infectado. *** $p < 0,0005$.

5.2. Perfil de citocinas durante a coinfeção por malária-salmonela em relação a mono-infecções por malária e salmonela

A resposta imune celular foi avaliada usando as citocinas MCP-1, IL-6, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17A nos dias D2, D4 e D8 (Figura 10). Em relação aos níveis, MCP-1, IL-6 e IFN γ foram os mais secretados (Figuras 10A-C), seguidos de TNF α , IL-4 e IL-10 (Figuras 10D-F), e os menos secretados foram IL-12 e IL-17A (Figuras 10G-H). Em relação às diferenças entre os grupos, os animais co-infectados apresentaram exacerbação das citocinas MCP-1, IFN γ e TNF α em relação ao aumento observado nos animais com malária (Figuras 10A, 4C e 4D). Por outro lado, os animais com mono-infecção por *S. Typhi* apresentaram ligeiro aumento de IL-12, o que difere dos demais grupos (Figura 10G). Outras citocinas analisadas apresentaram resultados inconclusivos, exigindo repetição. O aumento da secreção de IL-12 no grupo ST era esperado, devido à resposta imune contra patógenos intracelulares. Na malária, essa resposta foi reduzida enquanto a resposta inflamatória foi exacerbada na coinfeção, o que pode contribuir para a suscetibilidade do camundongo à invasão de *Salmonella*.

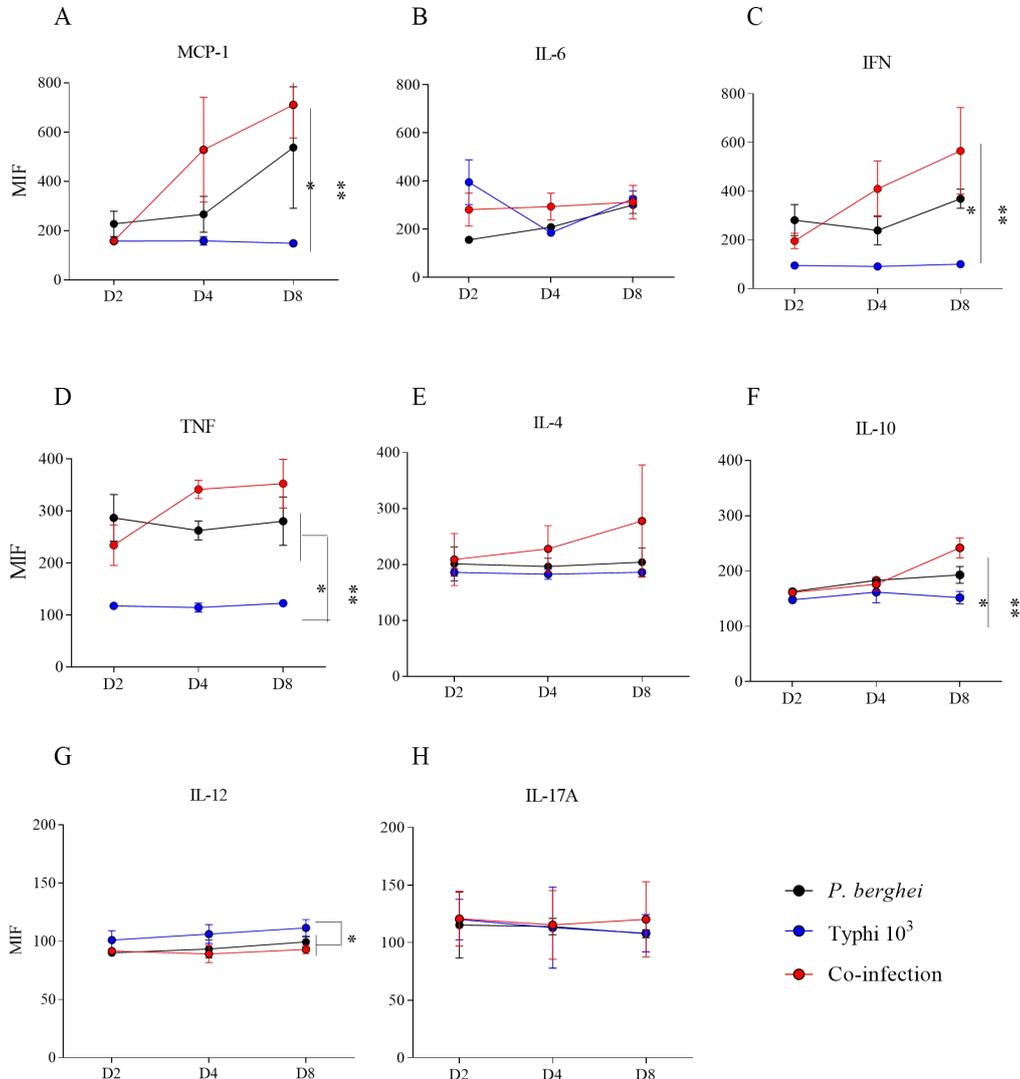


Figura 10 Dosagem de citocinas e quimiocinas nos dias D2, D4 e D8 no modelo de coinfeção. O plasma de cinco animais foi amostrado para a determinação de citocinas (MCP-1, IL-6, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-12 e IL-17A) utilizando o kit CBA/Becton Dickinson, EUA. Os dados para citocinas e quimiocinas de 5 animais são agrupados por média e desvio padrão em uma planilha do programa GraphPad Prism (versão 7). Asteriscos: nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$.

5.3. Avaliação da atividade fagocítica em subpopulações medulares

A susceptibilidade à *Salmonella* induzida pela malária envolve a supressão ou disfunção de neutrófilos e macrófagos, o que reduz sua atividade na eliminação de bactérias. Como uma importante citocina na resposta imune contra microrganismos intracelulares, como a IL-12, foi reduzida em animais mono-infectados com Pb-ANKA e co-infectados com *Plasmodium-Salmonella* no D8, foi avaliada a atividade fagocítica em subpopulações medulares por ser um órgão rico em fagócitos. As contagens de células totais não mostraram diferenças nos grupos co-infectados, mono-infectados e controle (Figura 11). As células foram incubadas por 24 horas e estimuladas com PMA por 1 hora, visto que para a morfologia clássica era viável, a análise de diferenciação celular mostrou uma contagem de neutrófilos e macrófagos muito baixa em comparação com os animais controle (Figura 12). Os neutrófilos foram mais afetados nos animais coinfectados em relação às mono-infecções diferenciadas do que os monócitos. Se a capacidade fagocítica foi preservada nas células diferenciadas foi analisado por contagem de células bacterianas internalizadas (Figura 13).

Foi possível observar redução das bactérias internalizadas em relação ao grupo controle, porém não houve diferença entre os grupos mono-infectados. No entanto, foi possível notar uma disfunção fagocítica proeminente de neutrófilos *ex vivo* em camundongos co-infectados.

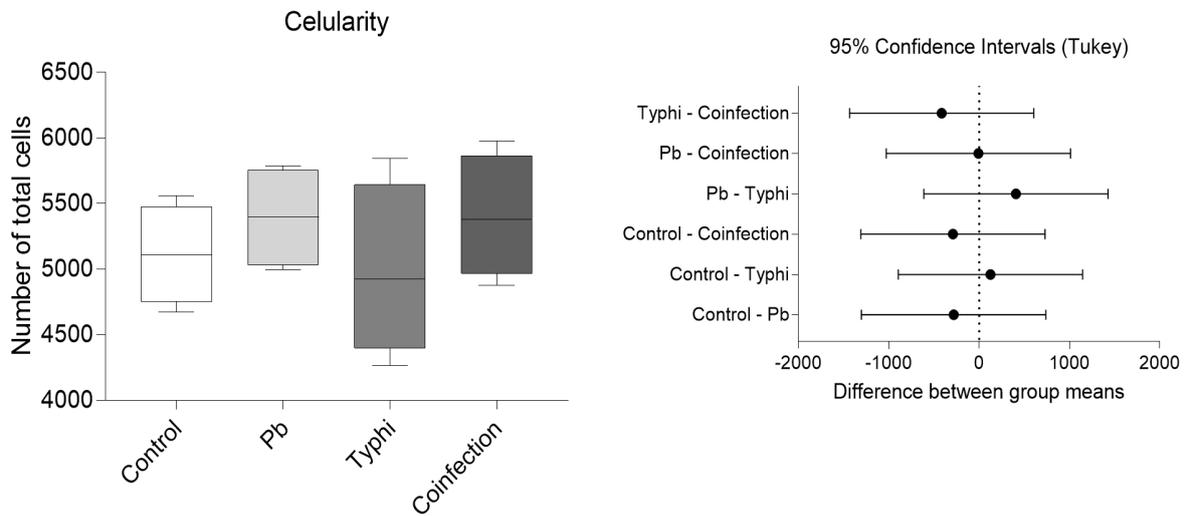


Figura 11 Número total de células analisadas microscopicamente nos camundongos co-infectados e demais controles. Não há diferença significativa entre eles.

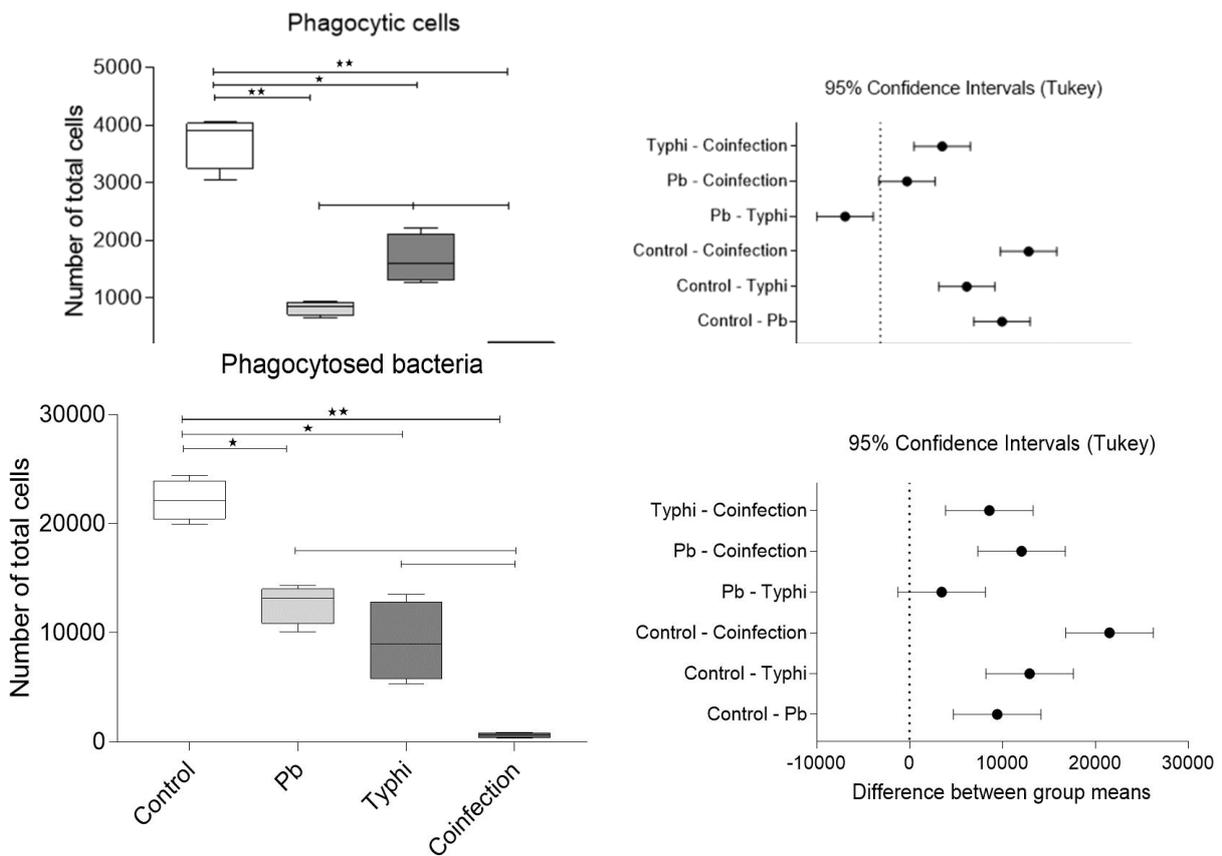


Figura 13 Número total de células bacterianas internalizadas nas subpopulações medulares. Grupo co-infectado apresenta clara disfunção fagocítica. * $p < 0,05$; ** $P < 0.005$.

5.4. Avaliação da presença de modulação bacteriana

Na mono-infecção malárica, uma dose intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA em D0 é capaz de causar a morte de camundongos BALB/c por volta do dia 20 devido a altos níveis de parasitemia (> 60-70%). A coinfeção não levou a um resultado pior do que a mono-infecção com malária. A parasitemia nos animais co-infectados evoluiu de forma semelhante à do *P. berghei* ANKA e continuou a crescer até a morte por volta de vinte dias, quando os animais foram eutanasiados (Figura 14). Também foi investigado se a cepa de *S. Typhi* usada no modelo sofreu alguma modulação que pudesse influenciar a capacidade de invasão em células não fagocitárias. O ensaio de invasão de células HeLa foi usado para comparar a cepa *S. Typhi* usada em condições pré-inóculo com a cepa ex vivo obtida de macerado de fígado. Ambos se comportaram de forma semelhante em relação à quantidade de células invadidas (Figura 15A), porém o pré-inóculo invadiu mais células HeLa após seis horas, o que indica que a bactéria pós-invasão não sofreu nenhuma modulação que a tornasse mais invasiva (Figura 15B).

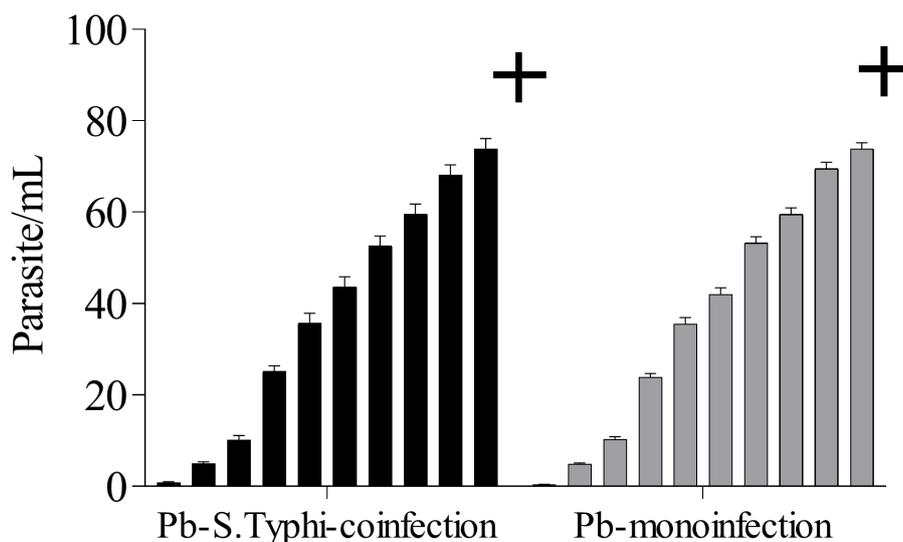


Figura 14 Crescimento de parasitemia (%) em ambos os grupos PB e CO. Não houve diferença significativa no avanço da parasitemia entre os grupos infectados por *P. berghei* ANKA.

5.5. Análise histopatológica do intestino

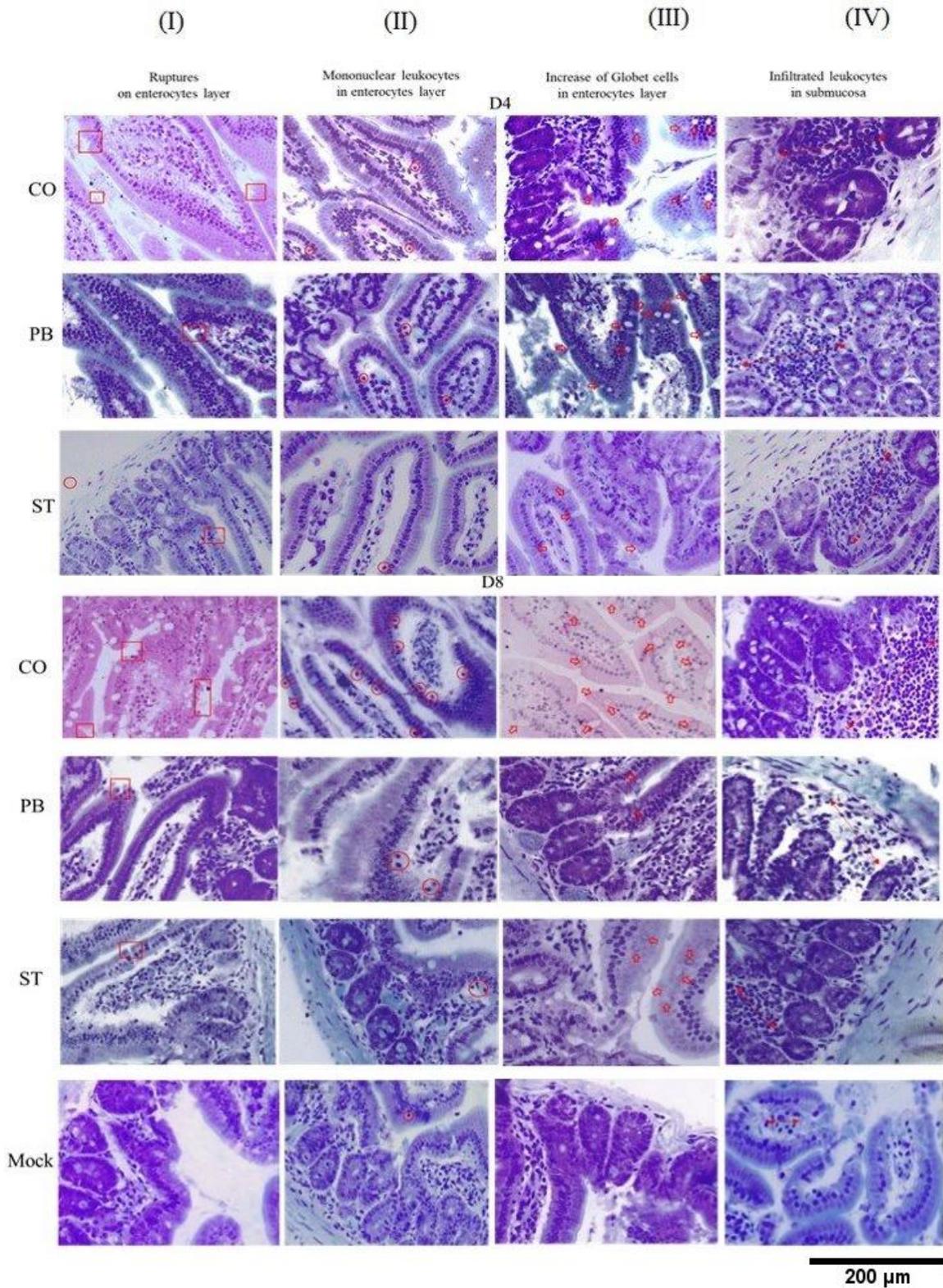


Figura 16 Irregularidades no intestino delgado de camundongos BALB/c causadas pela co-infecção malária-salmonela. CO: camundongos co-infectados. PB: camundongos mono-infectados *P. berghei* ANKA. ST: camundongos mono-infectados com *Salmonella enterica* sv Typhi. Fotomicrografias dos grupos CO, PB e ST distribuídas nas colunas I a IV entre D4 e D8. Última sequência de fotomicrografias com imagens de animais controle. Coluna I: apresentação de rupturas na borda da vilosidade (quadrado); coluna II: infiltrado de leucócitos mononucleares na camada de enterócitos (círculo); coluna III: destaque das células caliciformes (setas largas); coluna IV: dimensão do volume do infiltrado leucocitário na região submucosa (seta em ambas as extremidades).

Os resultados mostram que a invasão de *S. Typhi* foi principalmente devido à malária, e não à capacidade invasiva da bactéria. Para verificar se essas alterações no tecido intestinal eram significativas, os cortes histopatológicos foram submetidos à análises morfométricas. O volume e a parede intestinal não diferiram entre os grupos após a quantificação pela técnica de Cavalieri, nem as camadas submucosa, muscular e serosa apresentaram diferenças entre os grupos. As medidas morfométricas do volume intestinal nos cortes transversais dos cortes histopatológicos aumentaram em 100x. As irregularidades do tecido foram avaliadas em extensões longitudinais em 400x para investigar o efeito da co-infecção por *P. berghei* ANKA e *S. Typhi* na integridade do tecido intestinal, comparando com mono-infecções por *P. berghei* ANKA ou *S. Typhi* (Figura 16).

Quatro tipos de alterações foram evidentes, (I) aparecimento de rupturas na camada de enterócitos, (II) presença de leucócitos mononucleares na camada de enterócitos, (III) aumento de células caliciformes na camada de enterócitos e (IV) aumento no volume de leucócitos infiltrados na mucosa. Irregularidades nos tecidos intestinais foram quantificadas pelo princípio de Delesse. Foi possível observar rupturas na camada de enterócitos nos dias D4 e D8 nos três grupos (coluna I, Figura 16), mas os eventos aumentaram nos animais co-infectados (CO). Os animais mono-infectados com *P. berghei* ANKA (PB) apresentaram um ligeiro aumento nas rupturas, enquanto o animal mono-infectado com *S. Typhi* (ST) apresentou muito poucas rupturas, o que indica que estas rupturas podem ser a porta de entrada para a bactéria (Figura 18A).

A mucosa intestinal mostrou a presença de leucócitos mononucleares entre os enterócitos (coluna II, Figura 16). Nesse caso, os três grupos apresentaram mais do que o grupo controle, embora nos co-infectados o infiltrado leucocitário foi bem maior em D4 e D8 (Figura 18D). Em relação à presença de células mucoides ou caliciformes na camada epitelial (coluna III, Figura 16), apenas os animais co-infectados apresentaram aumento dessas células (Figura 18C). O volume de infiltrado leucocitário na submucosa foi calculado (coluna IV, Figura 16) e os três grupos diferiram do controle nos dois dias, enquanto o volume nos animais co-infectados foi maior do que nos dois grupos mono-infectados com *P. berghei* ANKA e *S. Typhi* (Figura 18B). Com isso, é possível sugerir que a malária provoca uma perturbação da homeostase intestinal e a torna suscetível à invasão de *Salmonella*. O volume total dos intestinos segundo método de Cavalieri não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 17A), assim como as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa segundo

o método de densidade de volume por princípio de Delesse não mostraram diferenças conclusivas entre os grupos analisados (Figura 17B-E).

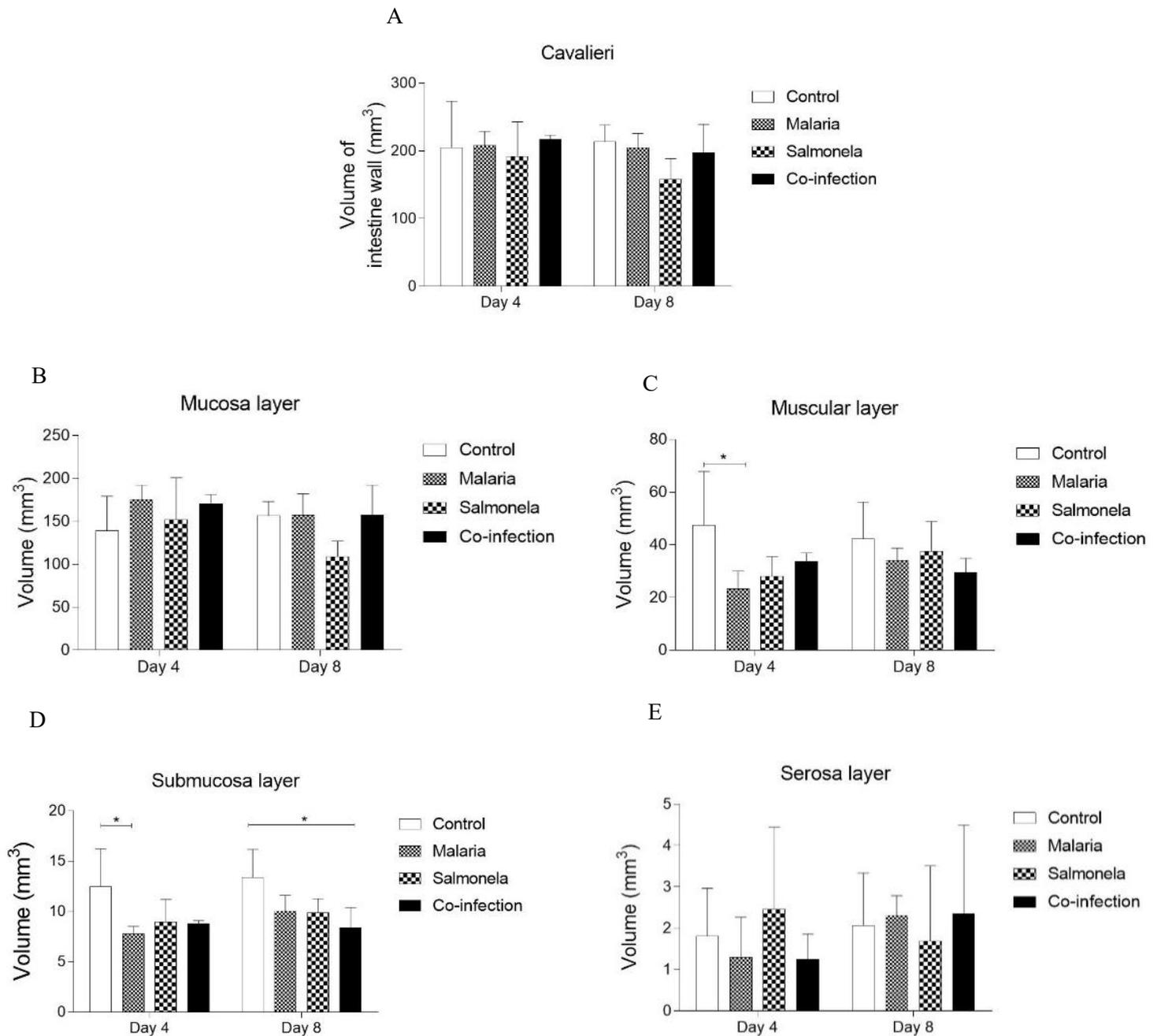
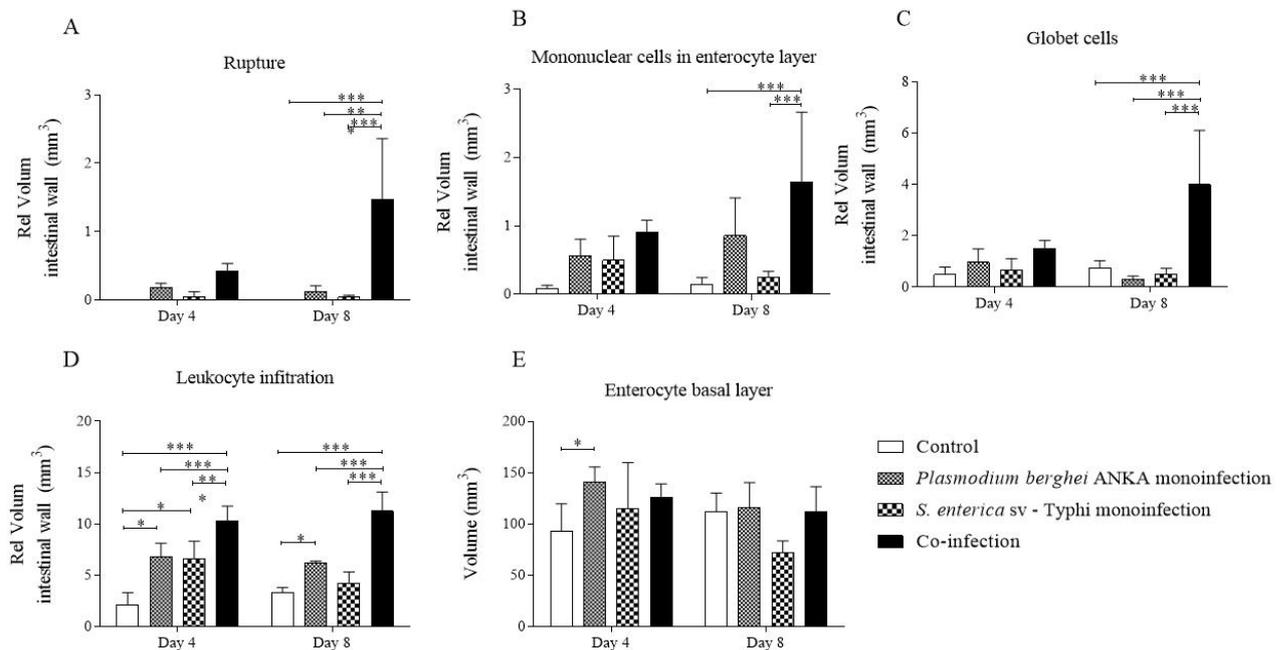


Figura 17 Quantificação de camadas do intestino delgado causadas pela coinfeção malária-salmonela. Na análise do volume de Cavalieri (A) não houve diferença significativa no volume total do intestino entre os grupos Controle, Malaria (mono-infectado por PB-ANKA), ST (mono-infectado pro *S. Typhi*) e CO (co-infectado malária-salmonela). Não houve diferença conclusiva entre as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa (B-E) segundo a definição da densidade de volume do princípio de Delesse entre os grupos analisados. Asteriscos: nível de significância de * $p < 0,05$.



6. Discussão

Crianças com co-infecção por malária e bacteremia por *Salmonella* apresentam taxas de letalidade mais altas em comparação com ambos os patógenos isoladamente (TAKEM et al. 2014; UNEKE 2008). A malária é um fator de risco para infecção invasiva por *Salmonella* em crianças na África. Devido à sobreposição em termos de distribuição geográfica, crianças com malária recente ou aguda têm maior risco de infecção bacteriana e morte (MACKENZIE et al. 2010). Esse conhecimento vem de estudos clínicos segundo os quais os efeitos da malária na resposta imune contra a bacteremia por *Salmonella* foram observados após a invasão bacteriana do tecido. A natureza exata dessa associação ainda é desconhecida, devido à heterogeneidade dos dados e à falta de controles adequados correspondentes à gravidade (revisado por TAKEM et al. 2014). Assim, pouco se sabe sobre se a malária afeta a resistência do hospedeiro à colonização intestinal com *Salmonella enterica* tifoide ou não tifoide após ingestão bacteriana. Neste trabalho, conseguimos desenvolver um modelo de coinfecção por *Salmonella Typhi* e *P. berghei* ANKA em camundongos BALB/c, nos quais os animais já

eram suscetíveis à bacteremia por *Salmonella* após um dia de infecção malárica. Nosso modelo levantou questões sobre os efeitos da malária na arquitetura do epitélio e invasão de *S. Typhi* e exacerbação da resposta inflamatória, bem como um fator de disfunção, especialmente em neutrófilos, levando a uma suscetibilidade à bacteremia.

Os mecanismos propostos para o efeito da malária na suscetibilidade à bacteremia por *Salmonella* envolvem vários fatores, como alterações na integridade da mucosa, disfunção de macrófagos e neutrófilos e prejuízo na produção de anticorpos (CUNNINGTON et al. 2012, LOKKEN et al. 2014, TAKEM et al. 2014, NYIRENDA et al. 2017). Embora seja uma infecção sistêmica aguda, sabe-se que os sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, são comuns durante a fase aguda da malária. A má absorção de nutrientes foi relatada na malária falciparum grave, sugerindo que o ambiente no lúmen intestinal pode ser alterado (BERKLEY et al. 2009, TANIGUCHI et al. 2015). Em um estudo sobre a malária falciparum, danos no epitélio intestinal foram evidenciados devido à permeação de compostos, como monossacarídeos e dissacarídeos, que normalmente são relativamente impermeáveis em uma mucosa intestinal saudável, mas neste caso foram observados na urina desses pacientes (WILAIRATANA et al. 1997). Nesse contexto, realizamos uma análise minuciosa do tecido intestinal nos cortes histopatológicos das infecções por malária no D8, a fim de avaliar as alterações no volume e tecido intestinal. O volume do lúmen e da parede intestinal não se alterou entre os grupos provavelmente porque no oitavo dia as alterações provavelmente ainda são focais. Um dos principais achados aqui observados foi que a mono-infecção pela malária *P. berghei* ANKA foi capaz de alterar a integridade da camada epitelial do intestino, o que pode permitir a entrada da bactéria *S. Typhi*. Esses achados estão de acordo com a permeabilidade do epitélio intestinal alterada em pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* e em modelos de malária murina (WILAIRATANA et al. 1997, TANIGUCHI et al. 2015).

Aqui, o aparecimento de rupturas na camada de enterócitos parece um descolamento do epitélio intestinal demonstrado por Taniguchi e colaboradores (TANIGUCHI et al, 2013). As rupturas foram exacerbadas pela presença de *Salmonella* em animais co-infectados, portanto, é possível sugerir que rupturas na camada epitelial causadas pela malária predisõem o hospedeiro à bacteremia (SCOTT et al. 2011, PARK et al. 2016). Além dessa exacerbação por todo o intestino delgado, também observamos uma presença abundante de células mucóides (células caliciformes) entre os enterócitos nos animais co-infectados. As

células caliciformes são responsáveis pela camada de muco que recobre o epitélio para facilitar a remoção do conteúdo alimentar e também fazem parte da primeira linha de defesa contra danos causados por bactérias patogênicas e produtos bacterianos (LV et al. 2018). Surpreendentemente, os animais co-infectados apresentaram várias dessas células mucóides na mucosa, o que indica que a resposta inata à bactéria da infecção foi ativa nesses animais. Uma vez que a bactéria se espalhou pela mucosa, o controle da infecção foi comprometido pela resposta inflamatória que levou à disfunção dos fagócitos, principalmente dos neutrófilos, e conseqüentemente da suscetibilidade à bacteremia (MOONEY et al. 2015). A abundância dessas células em animais co-infectados evidencia o papel dessa resposta antibacteriana, mas o desarranjo da homeostase intestinal causado pela malária compromete as funções essenciais no combate à infecção por *Salmonella*. Nossos achados apoiam a hipótese de que alterações no microambiente intestinal afetam a resistência à invasão por sorovares de *Salmonella enterica*.

O epitélio intestinal fornece uma barreira protetora contra patógenos entéricos e após a interrupção aumenta a suscetibilidade a infecções ou prejudica a imunidade (ALAMER et al, 2019). Modelos de camundongos da co-infecção *Plasmodium-Salmonella* mostraram comprometimento das funções de barreira intestinal caracterizadas por aumento da permeabilidade da barreira e aumento da infiltração de células na mucosa (ALAMER et al, 2019; MOONEY et al, 2014). Aqui, o maior infiltrado de leucócitos na mucosa em animais co-infectados, e que não diferiu dos mono-infectados com *P. berghei* ANKA, pode ser um importante evento de ligação entre a interrupção da homeostase intestinal e imunidade prejudicada à invasão de *Salmonella*. Este infiltrado é composto por monócitos inflamatórios e neutrófilos que podem ser permissivos a *Salmonella* spp. crescimento (MOONEY et al, 2019). Assim, a inflamação intestinal caracterizada pelo aumento do infiltrado leucocitário pode ser explorada pela bactéria para garantir sua sobrevivência e invasão (ALAMER et al, 2019; MOONEY et al, 2014).

A sequência de eventos após a chegada da bactéria ao intestino sugere que a capacidade do hospedeiro de controlar a infecção sistêmica por *Salmonella* está comprometida devido à infecção malárica. A susceptibilidade foi demonstrada em diferentes linhagens de malária de roedores ou com tratamento prévio com medicamentos que causam hemólise aguda, como fenil hidrazina ou hemina (CUNNINGTON et al. 2012). Os mecanismos imunológicos propostos sugerem que a hemólise causada pela malária resulta na

liberação de heme e na expressão de heme oxigenase-1, que é uma isoenzima essencial no papel citoprotetor contra estresse oxidativo e toxicidade do grupo heme (CUNNINGTON et al. 2012). Por outro lado, o heme induz a migração de neutrófilos, e a ativação e indução dessa enzima citoprotetora levam à disfunção dos fagócitos (CUNNINGTON et al. 2012; ORF & CUNNINGTON 2015). No modelo desenvolvido aqui, a hemólise de uma parasitemia relativamente baixa (~ 1%), 24 horas após a infecção intraperitoneal com 1×10^6 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA foi capaz de tornar os animais suscetíveis à salmonelose invasiva. Essas parasitemias são comumente observadas na malária humana, especialmente em crianças africanas, portanto, o pigmento hemozoína leucocitária é um preditor mais forte de malária do que a própria parasitemia (SCOTT et al. 2011). Nesse contexto, a hemozoína como metabólito parasita do grupo heme exerce efeito imediato sobre essa sequência de eventos. Nosso modelo mostrou uma diminuição na resistência do hospedeiro à colonização intestinal de *S. Typhi* um dia após a infecção com Pb-ANKA, o que mostra que a infecção concomitante pode mascarar o diagnóstico de infecção por salmonelose, enquanto o tratamento antimalárico ainda não melhorou os sintomas da criança (MOONEY et al. 2014).

Faltam informações sobre a atividade funcional dos neutrófilos e macrófagos contra *Salmonella* na presença prévia e contínua de uma infecção malárica. A disfunção dos fagócitos surge do acúmulo de hemozoína dependente de anemia hemolítica com comprometimento da produção sistêmica de IL-12 e indução de IL-10 (ROUX et al. 2010, CUNNINGTON et al. 2012, LOKKEN et al. 2014, MOONEY et al. 2014). Os estudos que sugerem falha da atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos como fator de suscetibilidade baseiam-se principalmente em estudos clínicos. A disponibilidade de cultura *ex vivo* de fagócitos pode confirmar *in vitro* sua atividade disfuncional como fator de suscetibilidade à malária. Neste estudo, avaliamos a capacidade fagocítica de progenitores de neutrófilos e macrófagos obtidos da medula femoral. O modelo mostrou uma disfunção neutrofílica proeminente, concomitante com a exacerbação das quimiocinas IFN γ , TNF α e MCP-1 em camundongos co-infectados em D8, que não foi observada em animais desafiados apenas pela mono-infecção por *Salmonella* (D1). No D2, duas citocinas inflamatórias já haviam sofrido aumentos que provavelmente comprometeram as funções essenciais de combate à infecção por *Salmonella*, enquanto os animais mono-infectados por *Salmonella* apresentaram aumento da secreção de IL-12 e infecção controlada. Aumentos nas citocinas IFN γ e TNF α exacerbados em D8, juntamente com a quimiocina MCP-1 em animais infectados com malária e co-infectados estão de acordo com o efeito sistêmico da resposta à

malária nos precursores de neutrófilos e macrófagos, que reduzem a resistência do patógeno, conforme observado em estudos clínicos (CUNNINGTON et al. 2012; MOONEY et al. 2015).

Nossas descobertas fornecem uma visão mecanicista sobre como as respostas da mucosa a um patógeno bacteriano são alteradas em uma infecção de malária simultânea. Ainda assim, a perda dessa resistência aos patógenos bacterianos parece ser independente de alguma modulação que possa ocorrer com a bactéria no interior do hospedeiro, pois as bactérias invasivas e recuperadas do fígado dos animais co-infectados não se tornaram mais virulentas que as bactérias pré-inóculo. Nossos dados estão de acordo com estudos com uma cepa comensal de *Escherichia coli* não invasiva exibiu colonização intensificada em animais previamente infectados com *P. yoelii* (MOONEY et al. 2015), o que sugere que a perturbação da comunidade microbiana pela malária abre um nicho ecológico que pode ser aproveitado por bactérias patogênicas (LOKKEN et al. 2014, MOONEY et al. 2014, 2015).

Uma limitação do estudo foi o uso de um sorovar Typhi da linha *Salmonella enterica*, uma vez que a bacteremia pediátrica causada por infecção por *P. falciparum* envolve principalmente *Salmonella* invasiva não tifóide. Além disso, os modelos de co-infecção ou mono-infecção em camundongos usam *S. enterica* sorovar Typhimurium porque se espalha sistemicamente neste hospedeiro (CUNNINGTON et al. 2012, LOKKEN et al. 2014, MOONEY et al. 2014, FORBESTER et al. 2015). A partir de três sorovares de *Salmonella enterica*, definimos uma dose com *S. Typhi* que conseguiu evoluir na invasão de camundongos BALB/c apenas naqueles previamente infectados com malária. Outra limitação foi que, em nosso modelo, o hospedeiro foi desafiado com a bactéria um dia após a infecção por malária, enquanto as crianças que desenvolvem coinfeção malária-salmonela provavelmente já estão colonizadas por essas bactérias patogênicas (GÓMEZ-PÉREZ et al. 2014). Apesar dessas limitações, nosso modelo nos forneceu uma nova visão sobre a alteração da mucosa intestinal que predispôs camundongos BALB/c à bacteremia por malária.

7. Conclusões

Embora o conhecimento da malária como fator de suscetibilidade à bacteremia por *Salmonella* seja evidente, os mecanismos fisiopatológicos ainda não são bem compreendidos devido à sua complexidade e à falta de modelos experimentais bem estabelecidos. Este estudo teve como objetivo estabelecer um modelo experimental e avaliar a fisiopatologia com melhor cobertura da histopatologia intestinal, fatores imunológicos sistêmicos e ensaios funcionais de disfunção fagocítica. A exacerbação inflamatória evidenciada pelo aumento de citocinas e quimiocinas com disfunção principalmente de neutrófilos também é bem conhecida e foi bem caracterizada como efeito de uma resposta inflamatória exacerbada. Nossos principais achados foram a alteração da integridade epitelial do intestino causada pela mono-infecção por *P. berghei* como possível causa de suscetibilidade à invasão de *Salmonella*.

O conhecimento da influência no tecido intestinal e da interação dos mecanismos imunes efetores na co-infecção malária-salmonela são absolutamente essenciais para estratégias de combate à bactéria nas populações afetadas.

As informações obtidas com estudos em modelos experimentais são importantes principalmente quando obstáculos como considerações éticas, limitações de recursos ou outros fatores burocráticos limitam estudos clínicos, de infecções diretas em humanos. O desenvolvimento de modelos animais realizados sob condições laboratoriais controladas podem fornecer consideráveis dados acerca da patogênese e controle de doenças humanas.

8. Referências Bibliográficas

1. Alamer, E. S. et al. **Dissemination of Non-typhoidal *Salmonella* During *Plasmodium chabaudi* Infection Affects Anti-malarial Immunity.** Parasitol Res. 118, 2277–2285 (2019).
2. Basu S & Sahi PK. **Malaria: An update.** Indian J Pediatr. 2017. 84: 521.
3. Bearson SM, Bearson BL, Rasmussen MA. **Identification of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* genes important for survival in the swine gastric environment.** Appl. Environ. Microbiol. 2006. 72:2829–2836.
4. Berkley JA, Bejon P, Mwangi T, Gwer S, Maitland K, Williams TN, Mohammed S, Osier F, Kinyanjui S, Fegan G, Lowe BS, English M, Peshu N, Marsh K, Newton CRJC: **HIV infection, malnutrition, and invasive bacterial infection among children with severe malaria.** Clin Infect Dis 2009, 49:336–343.
5. Besser JM. ***Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change.** Food Microbiology. 2017. 71:55-59.
6. Biggs HM, Lester R, Nadjm B, Mtove G, Todd JE, Kinabo GD, Philemon R, Amos B, Morrissey AB, Reyburn H, Crump JA: **Invasive *Salmonella* infections in areas of high and low malaria transmission intensity in Tanzania.** Clin Infect Dis 2014, 58(5):638–6347.
7. Borsoi, A, et al. **Behavior of *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis* strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns.** Braz. J. Microbiol. 2011, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 266-273.
8. Brenner, FW, Villar, RG, Angulo, FJ, Tauxe, R, & Swaminathan, B. (2000). **Nomenclatura de *Salmonella*.** Journal of Clinical Microbiology , 38 (7), 2465 - 2467
9. Bronzan RN, Taylor TE, Mwenechanya J, Tembo M, Kayira K, Bwanaisa L, et al. **Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome.** J Infect Dis. 2007; 195(6):895–904.
10. Buffon, G.L.L., Comte de 1777. **Essai d'arithmétique morale.** In Supplément à l'Historie Naturelle.
11. Cavalieri, B., 1635. **Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota.** Bologna. First edition Bologna. 1635.

12. Chau JY, Tiffany CM, Nimishakavi S, Lawrence JA, Pakpour N, Mooney JP, Lokken KL, Caughey GH, Tsois RM, Luckhart S. **Malaria-associated L-arginine deficiency induces mast cell-associated disruption to intestinal barrier defenses against Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia.** Infect Immun; 2013. 81:3515-26.
13. Cheminay C, Chakravorty D, Hensel M. **Role of neutrophils in murine salmonellosis.** Infect Immun. 2004;72(1):468-477. doi:10.1128/iai.72.1.468-477.2004
14. Cowman A. F., Healer J., Marapana D., Marsh, K. (2016). **Malaria: Biology and Disease.** Cell, 167(3), 610–624.
15. Cruz-Orive, L.M., 1980. **On the estimation of particle number.** Journal of microscopy. 120, 15-27.
16. Cruz-Orive, L.M., 1999. **Precision of Cavalieri sections and slices with local errors.** Journal of microscopy. 193, 182-198.
17. Cunnington AJ, De Souza JB, Walther M, Riley EM. **Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme and hemoxygenase dependent dysfunctional granulocyte mobilization.** Nat Med. 2012. 18:120-127.
18. Cunnington AJ, Riley EM: **Suppression of vaccine responses by malaria: insignificant or overlooked?** Exp Rev Vaccine 2010, 9:409–429.
19. Dekker JP, Frank KM. ***Salmonella, Shigella and Yersinia.*** Clin. Lab. Med. Jun: 2015;35 (2): 225-46.
20. Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. **Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa.** Lancet. 2012; 379(9835):2489–99.
21. Godinez I, Haneda T, Raffatellu M, et al. **T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa.** Infect Immun. 2008;76(5):2008-2017. doi:10.1128/IAI.01691-07
22. Gomez-Perez GP, van Bruggen R, Grobusch MP, Dobano C: ***Plasmodium falciparum* malaria and invasive bacterial co-infection in young African children: the dysfunctional spleen hypothesis.** Malar J 2014, 13:335.
23. Gundersen, H., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J., Pakkenberg, B., Sørensen, F., Vesterby, A., 1988. **Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis.** Apmis. 96, 379-394.

24. Gundersen, H., Østerby, R., 1981. **Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well!’**. Journal of microscopy. 121, 65-73.
25. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE: **Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease**. Ann Rev Pathol 2007, 2:217–249.
26. Howard, C.V., Reed, M.G., 2005. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
27. Howard, V., Reed, M.G., 2010. **Unbiased stereology**.
28. Johnson R, Mylona E, Frankel G. **Typhoidal *Salmonella*: Distinctive virulence factors and pathogenesis**. Cell Microbiol. 2018;20(9):e12939. doi:10.1111/cmi.12939.
29. Knodler LA, Elfenbein JR. ***Salmonella enterica*** [published correction appears in Trends Microbiol. 2020 Jan;28(1):83]. Trends Microbiol. 2019;27(11):964-965. doi:10.1016/j.tim.2019.05.002
30. Kremer, J.R., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R., 1996. **Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD**. Journal of structural biology. 116, 71-76.
31. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, et al. **Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury**. PLoS Pathog. 2015;11(3):e1004651. Published 2015 Mar 12. doi:10.1371/journal.ppat.1004651
32. Mabey DC, Brown A, Greenwood BM. ***Plasmodium falciparum* malaria and *Salmonella* infections in Gambian children**. J Infect Dis. 1987; 155(6):1319–21.
33. Mackenzie G, Ceesay SJ, Hill PC, Walther M, Bojang KA, Satoguina J, Enwere G, D'Alessandro U, Saha D, Ikumapayi UN, O'Dempsey T, Mabey DC, Corrah T, Conway DJ, Adegbola RA, Greenwood BM: **A decline in the incidence of invasive non-typhoidal *Salmonella* infection in The Gambia temporally associated with a decline in malaria infection**. PLoS ONE 2010, 5:e10568.
34. Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H., Möller, P., 1990. **Estimation of surface area and length with the orientator**. Journal of microscopy. 159, 301-317.
35. Mayhew, T., 1991. **The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs**. Experimental Physiology. 76, 639-665.
36. Mooney JP, Butler BP, Lokken KL, Xavier MN, Chau JY, Schaltenberg N, Dandekar S, George MD, Santos RL, Luckhart S, Tsohis RM. **The mucosal inflammatory**

- response to non-typhoidal *Salmonella* in the intestine is blunted by IL-10 during concurrent malária parasite infection.** *Mucosal Immunology*, 2014; Volume 7 | Number 6.
37. Mooney JP, Galloway LJ, Riley EM. **Malária, anemia e doença bacteriana invasiva: um problema de neutrófilos?.** *J Leukoc Biol.* 2019; 105 (4): 645-655. doi: 10.1002 / JLB.3RI1018-400R
 38. Mooney JP, Lokken KL, Byndloss MX, George MD, Velazquez EM, Faber F, Buntler BP, Walker GT, Ali MM, Potts R, Tiffany C, Ahmer BMM, Luckhart S, Tsolis RM. **Inflammation-associated alterations to the intestinal microbiota reduce colonization resistance against non-typhoidal *Salmonella* during concurrent malaria parasite infection.** *Sci. Rep.* 2015. 5, 14603; doi: 10.1038/srep14603.
 39. Mouton, P.R., 2011. **Unbiased stereology: a concise guide.** JHU Press.
 40. Mtove G, Amos B, Nadjm B, Hendriksen IC, Dondorp AM, Mwambuli A, Kim DR, Ochiai RL, Clemens JD, von Seidlein L, Reyburn H, Deen J: **Decreasing incidence of severe malaria and community-acquired bacteraemia among hospitalized children in Muheza, north-eastern Tanzania, 2006–2010.** *Malar J* 2011, 10:320.
 41. Nadjm B, Amos B, Mtove G, Ostermann J, Chonya S, Wangai H, Kimera J, Msuya W, Mtei F, Dekker D, Malahiyo R, Olomi R, Crump JA, Whitty CJ, Reyburn H: **WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: prospective study.** *BMJ* 2010, 340:c1350.
 42. Nii, Takahiro & Kakuya, Haruna & Isobe, Naoki & Yoshimura, Yukinori. ***Lactobacillus reuteri* Enhances the Mucosal Barrier Function against Heat-killed *Salmonella Typhimurium* in the Intestine of Broiler Chicks.** *The Journal of Poultry Science*, 2019. 57. 10.2141/jpsa.0190044.
 43. Nyengaard, J. R., & Alwasel, S. H. (2014). **Practical stereology of the stomach and intestine.** *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 196(1), 41–47.
 44. Nyirenda TS, Mandala WL, Gordon MA, Mastroeni P. **Immunological bases of increased susceptibility to invasive nontyphoidal *Salmonella* infection in children with malaria and anaemia.** *Microbes and Infection* 20 (2018) 589e598.
 45. Ochoa, I.M.F.; Rodriguez, A.V. 2005. **Mecanismos moleculares de patogenicidad de**

46. Patel DK, Mittal S, Tiwari N, Maurya AK, Singh D, Pandey AK, Pal A. **Plasmodium-Salmonella co-infection induces intense Inflammatory response, Oxidative Stress and Liver Damage: a mice model study for therapeutic strategy.** Shock. 2018 Feb 1
47. Potts RA, Tiffany CM, Pakpour N, Lokken KL, Tiffany CR, Cheung K, Tsolis RM, Luckhart S. **Mast cells and histamine alter intestinal permeability during malaria parasite infection.** Immunobiology. 2016 March ; 221(3): 468–474.
48. Roux CM, Butler BP, Chau JY, Paixao TA, Cheung KW, Santos RL, et al. **Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to Nontyphoidal Salmonella enterica serovar typhimurium infection in mice.** Infect Immun. 2010; 78(4):1520–7.
- Salmonella sp.* Review Article, v.47, n.1-2, p.25-42.
49. Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ. **Molecular insights into farm animal and zoonotic Salmonella infections.** Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. 2009. Sci. 364:2709 –2723.
50. Su LH, Chiu CH. 2007. **Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature.** Chang Gung Med. J. 30:210 –219.
51. Su XZ, Lane KD, Xia L, Sá JM, Wellems TE. **Plasmodium Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution.** Clin Microbiol Rev. 2019;32(4):e00019-19. Published 2019 Jul 31. doi:10.1128/CMR.00019-19.
52. Takem EN, Roca A, Cunningham A. **The association between malaria and nontyphoid Salmonella bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review.** Malaria Journal 2014, 13:400.
53. Takeuchi A. **Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium.** Am J Pathol. 1967;50(1):109-136.
54. Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, et al. **Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis** [published correction appears in Sci Rep. 2016;6:17248]. Sci Rep. 2015;5:15699. Published 2015 Oct 27. doi:10.1038/srep15699

55. van Santen S, de Mast Q, Swinkels DW, van der Ven AJAM. **The iron link between malaria and invasive non-typhoid *Salmonella* infections.** Trends Parasitol. 2013 May; 29(5): 220–227. doi:10.1016/j.pt.2013.03.006.
56. Vandenberg O, Nyarukweba DZ, Ndeba PM, Hendriksen RS, Barzilay EJ, Schirvel C, Bisimwa BB, Collard JM, Aidara Kane A, Aarestrup FM: **Microbiologic and clinical features of *Salmonella* species isolated from bacteremic children in eastern Democratic Republic of Congo.** Pediatr Infect Dis J 2010, 29:504–510.
57. Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chausse AM, Grepinet O, Namdari F, Roche SM, Rossignol A, VirlogeuxPayant I. **Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis.** Open Microbiol. 2012. 1:243–258.
58. Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, et al. **Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis.** Microbiologyopen. 2012;1(3):243-258. doi:10.1002/mbo3.28
59. Wassmer SC, Grau GER. **Severe malaria: what’s new on the pathogenesis front?** Int J Parasitol. 2017 February; 47(2-3): 145–152.
60. Weibel, E.R., 1980. **Stereological methods.** Academic Press London.
61. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. **Malaria.** Seminar, 2013, August 15. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0).
62. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, et al. **Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*.** Nature. 2010;467(7314):426-429. doi:10.1038/nature09415
63. World Health Organization: **World Malaria Report; 2020.**

