

ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE

Investigação in silico da malária falcípara: estado atual e perspectivas

In silico research of falciparum malaria: current status and perspectives

[Ademir Nunes Ribeiro Júnior](#), [Romário Brunes Will](#), [Lucas Borges Gomes Ferreira Pinto](#), [Moises Henrique Pereira](#), [Mateus de Lana Orlovski](#), [Maurilio de Araujo Possi](#), [Paulo Sérgio Balbino Miguel](#), [Daniela Rezende Moreira](#), [Alcione de Paiva Oliveira](#), [Luiz Alberto Santana](#), [Andréia Patrícia Gomes](#)

Recebido: 08 de Outubro de 2018 | Aprovado: 15 de Outubro de 2018 | Publicado: 02 de Dezembro de 2018

Atualidades Médicas - Volume 2 - Edição nº 3 - Ano 2018 - Maio, Junho | Páginas: 129-136 | DOI:

© Copyright MRCOM. Todos os direitos reservados.

Resumo

A malária é tida como uma doença de grande magnitude, sendo considerada uma das doenças parasitárias de maior importância em âmbito global, logo ampliação da compreensão da fisiopatologia da entidade nosológica é de extrema importância no contexto das doenças transmitidas por artrópodes. Assim, diante da necessidade de entender, mais pormenorizadamente, e de aferir, tanto o comportamento do inóculo quanto das células sanguíneas, como a resposta imunológica do organismo humano na interação com o patógeno, optou-se pela investigação com base na simulação computacional, com a utilização de simulador do sistema imunológico (AutoSimmune), que tem por base a modelagem de agentes reativos e máquinas de estado, propiciando a simulação de interações celulares em um ambiente virtual, com precisão. A partir desse estudo, in silico, novas proposições e levantamento de hipóteses acerca da complexa interação microrganismo-hospedeiro humano podem ser levantadas, criando espaço para intervenções e pesquisas in vitro e vivo na busca do desenvolvimento de estratégias efetivas na prevenção, controle e tratamento da infecção.

Summary

Malaria is considered a widespread disease and one of the most important parasitic diseases, therefore a better understanding of such morbidity is of the utmost importance. Due to the need for better understand and assess the behavior of the inoculum as well as the blood cells and the responses of the human organism, it was decided to use an immune system simulator (AutoSimmune), which uses artificial intelligence based on reactive agents and modeled by state machine capable of simulating real cellular interactions in a virtual environment-quite accurately. From this study (in silico), new propositions and hypotheses about the complex interaction among microorganism and human host can be raised, creating space for interventions and research for the development of infection prevention, control and treatment strategies.

Unitermos/Uniterms

Biologia Computacional Informática Médica Plasmodium Malária Computational Biology Informatic Medical

Plasmodium Malária

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa e tem como vetor de transmissão o mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Quando um mosquito infectado pelo parasita pica o ser humano, ocorre a inoculação, o que gera alterações clínicas no indivíduo causando a moléstia. É considerada uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo, tendo como agente o protozoário *Plasmodium*, sendo cinco espécies as responsáveis por acarretar todas as infecções de malária

humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium ovale* (WHITE, 2014; GOMES *et al.*, 2018).

A doença é transmitida em mais de 100 países e em 2016 calcula-se que tenha ocorrido 216 milhões de casos em todo o mundo, 90% desses em países da África. O agente etiológico responsável pela doença se distribui de maneira diferente em regiões distintas, sendo o *P. falciparum* principal causador na África com 99,7% dos casos e o *P. vivax* aparece em 64% nas Américas (WHO, 2017).

Em escala global, de 2010 a 2016, a taxa de incidência de malária teve uma queda de 18%, passando de 76 para 63 casos por 1000 habitantes em situação de risco. Apesar disso, o número de mortes ainda é muito alto, estima-se que haja 445 mil mortes em todo o mundo e 407 mil, cerca de 91%, só na região africana (WHO, 2017).

O ciclo biológico do *Plasmodium* começa na ingestão de sangue humano infectado com gametócitos, pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. No interior do intestino do inseto, essas estruturas emergem das hemácias na forma de gametas masculinos e femininos e se unem, diferenciando-se em oocinotos, adentram à parede do trato gastrointestinal e se transformam em oocitos – que pode comportar mil esporozoítos. Após esse processo de maturação, o mesmo é transportado para as glândulas salivares, por meio da hemolinfa, de onde será capaz de ser expelido posteriormente (REY, 2008).

Durante a picada do mosquito no ser humano, os esporozoítos são inoculados, e levam cerca de horas para perpassar pelo tecido dérmico e pelas barreiras celulares até alcançar o sistema linfático e o sangue, sendo deslocado até ao fígado e infectando os hepatócitos. Dentro das células do fígado, o parasita se diferencia em criptozoita, passa por um processo de divisão por esquizogonina e se diferencia em merozoítos. Cada hepatócito chega a comportar uma quantia de 10.000 a 30.000 merozoítos e ainda assim. Apesar da quantidade maciça de parasitos, não são observadas manifestações clínicas. Essa fase pode demorar de uma a duas semanas para o *P. falciparum* e *P. malariae*, enquanto que para outras espécies como o *P. vivax* e *P. ovale* podem se diferenciar em hipnozoítos e perdurar por meses ou anos numa forma de latência até que atinja a corrente sanguínea, manifestando-se tardiamente como recaída de doença (NAGARAJ *et al.*, 2013).

Ao atingir a circulação sanguínea, após sair dos hepatócitos, o patógeno se move em direção à hemácia e adentra, iniciando o ciclo intra-eritrocítico. No interior da célula vermelha do sangue o merozoíta se modifica em trofozoíta, proliferando-se em um processo de esquizogonina. Após a maturação do esquizonte, esse se diferencia, rompe o eritrócito colocando na circulação cerca de 8 a 18 novos merozoítos, no caso do *P. vivax* e aproximadamente 32 numa infecção por *P. falciparum*, que repetirão esse processo (REY, 2008; COURA, 2013).

As características desse processo cíclico propiciam a formação de uma biomassa parasitária significativa e de um aumento exponencial, provocando febre e outros processos patológicos, como por exemplo anemia e obstrução de vasos sanguíneos (BUFFET *et al.*, 2011).

Nessa sequência de fenômenos, algumas células e estruturas possuem relações diretas e determinantes no curso da doença. Os macrófagos são células originadas dos monócitos e que executam papéis imprescindíveis durante a infecção malárica. De fato, estão em diferentes órgãos, envolvidos no controle da infecção por *Plasmodium*, sejam esses no fígado (células de Kupffer), baço (macrófagos esplênicos) e medula óssea. Os mecanismos de atuação dessas células em um processo infeccioso por malária são diversos, realizando fagocitoses, produção de citocinas e inibição celular dependente de anticorpo. A fagocitose pode ser independente de opsonização, que é o que ocorre com alguns eritrócitos infectados devido às alterações estruturais, entretanto, muitas vezes, esse comportamento celular é em decorrência do encontro com estruturas opsonizadas por anticorpos ou mesmo complemento, seja o eritrócito infecto pelo parasita ou o próprio merozoíta circulante (CHUA, 2013; COURA, 2013).

Apesar de algumas informações sobre as respostas do corpo humano diante da infecção, elas ainda são limitantes. O sistema imune é tido como um dos sistemas de extrema complexidade do organismo e uma função defectível pode acarretar em riscos severos para a vida do indivíduo. Mesmo com décadas de estudo (*in vivo* e *in vitro*), investimentos em pesquisas e avanços tecnológicos, a imunidade ainda é considerada um desafio para os pesquisadores, devido ao conhecimento lacunar do seu comportamento, mecanismos e interações enigmáticas. Diante disso, uma outra abordagem para esse estudo é a pesquisa *in silico*, realizada computacionalmente (POSSI, 2012).

Por se tratar de um estudo *in silico*, a pesquisa pode ser realizada de modo a atingir resultados de extrema relevância sem precisar de altos recursos materiais e financeiros, além de ser possível simular uma situação e fazer análise com uma amostra significativa de modo rápido, pois meses de infecção podem ser simulados em poucas horas no sistema. Além disso, a pesquisa não se trata de uma investigação envolvendo seres humanos, e por consequência disso não há implicações éticas de acordo com os termos da Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Com isso, esse estudo busca uma alternativa nos estudos de malária através do desenvolvimento de uma simulação computacional com multi-agentes capaz de resultar em respostas equiparáveis com os fenômenos reais e que demonstre parte do comportamento da resposta imunológica de um ser humano após ser infectado por *Plasmodium falciparum*, visando uma melhor compreensão da doença (POSSI, 2012; GOMES *et al.*, 2016).

SIMULAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Plasmodium falciparum*

Neste estudo, utilizamos uma ferramenta chamada *AutoSimmune*, que se trata de um programa que utiliza de inteligência artificial por sistemas multi-agente, ou seja, usa de elementos reativos que se comportam de modo a reagir com outros agentes, as condições do meio e o estado em que se encontram, o que permite simular interações próximas às reais. O comportamento de cada agente é definido por máquinas de estado, isto é, regras que determinam todas suas possíveis ações em diferentes condições. (POSSI, 2012). Todos os agentes do sistema são implementados através de uma máquina de estados, dessa forma pode-se descrever suas ações por meio de seus estados e transições entre eles, sendo que um estado atual é o resultado de uma sequência de estados anteriores (GOMES *et al.*, 2016).

O tempo é definido como *tick*, unidade necessária para a mudança de estado do ambiente. O espaço usa linhas verticais e horizontais para formação das células, criando um conceito de Grid. Devido às características desse espaço, os agentes nele imersos movimentam-se apenas em sua vizinhança, seguindo a formulação de Moore, onde se garante que terão que percorrer caminhos, evitando que ocorra “saltos”, até seus destinos (se o tiverem). Outras características importantes desse espaço são: a simulação de um espaço toroidal, onde suas extremidades opostas estão interligadas, permitindo o trânsito dos agentes; e a simulação de um espaço 3D em ambiente 2D, o que permite que múltiplos agentes estejam sobrepostos em uma mesma posição do Grid (POSSI, 2012).

Outro ponto que precisa ser caracterizado é o ambiente em que os agentes estarão inseridos, denominados zonas. As zonas são a representação de área do organismo em que os agentes irão reagir e desempenhar suas funções. Cada zona possui características específicas como tamanho, quais agentes podem estar e passar por ela e todas as informações necessárias para a coerência da simulação (POSSI, 2012).

O agente etiológico *Plasmodium falciparum* foi implementado como um agente reativo que executa os seguintes passos: iniciando na zona *Tissue* o agente permanece durante um período de tempo, determinado por um número específico de *ticks*, no estágio *PréEritrócito*; ao fim desse período, o agente então começa a circular aleatoriamente pelo ambiente até encontrar uma célula; ao encontrar, tenta identificá-la como um glóbulo vermelho; caso reconheça, entra e permanece em estado de “infectante” por um número de *ticks*; caso a infecção seja bem sucedida, o agente passa para o estado de “reprodução assexuada”, executando assim o processo de replicação; porém, se a tentativa de infectar a célula falhar, ele retorna ao estado de movimento aleatório, até que encontre outra célula e tente infectá-la (podendo ou não ter sucesso) ou até que seu “tempo de vida” se esgote e ele seja eliminado (vide Figura 1) (GOMES *et al.*, 2016).

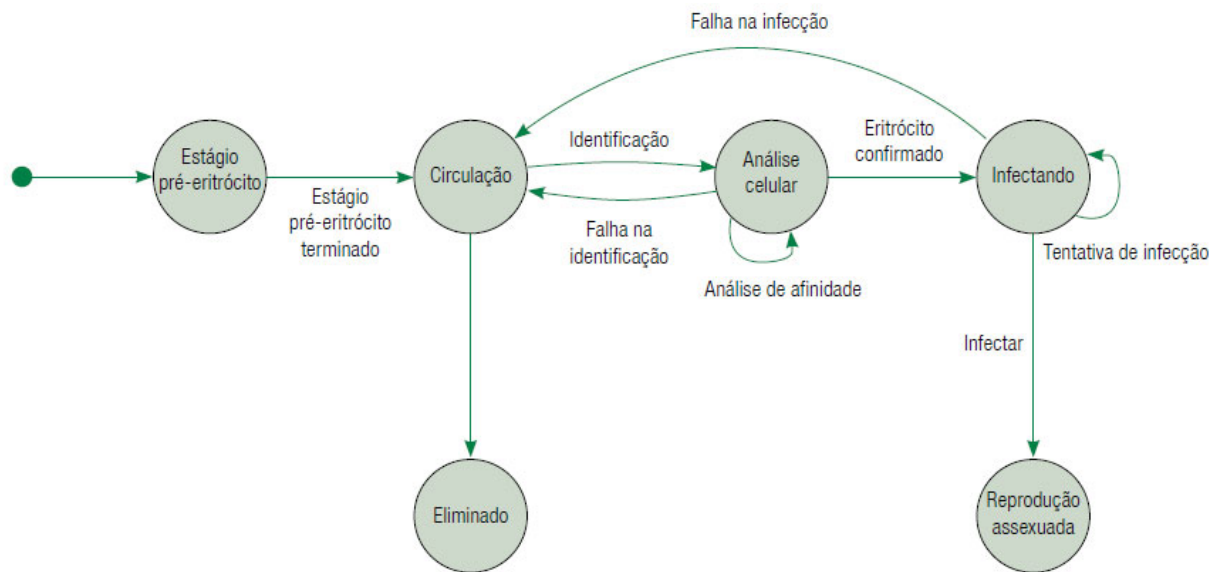


Figura 1. Máquina de estados do *Plasmodium falciparum*.

Sobre o agente *Eritrócito*: sua criação se dá na zona *Bone Marrow* e logo em seguida segue para a zona *Circulation* onde fica no estado de movimento aleatório; nesse período o agente pode ou não ser infectado pelo agente *Plasmodium*; caso infectado, o agente continua se movendo aleatoriamente até o fim de sua meia vida, quando então é direcionado para o baço, onde é descartado; se não for infectado, permanece circulando normalmente até seu tempo limite, quando também é descartado (vide Figura 2) (GOMES *et al.*, 2016).

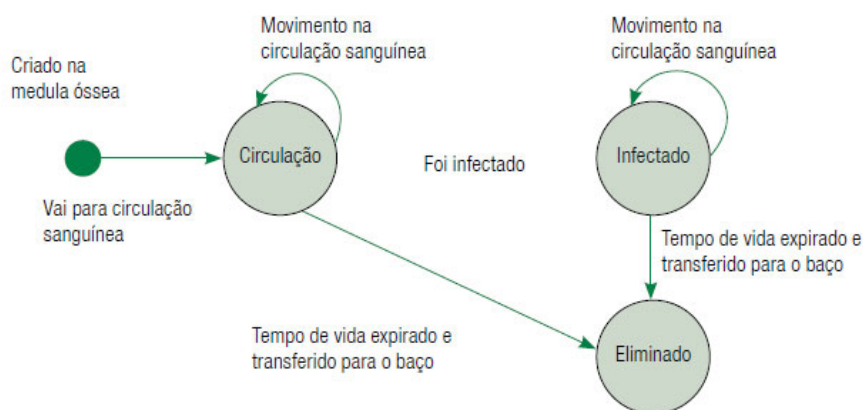


Figura 2. Máquina de estados do eritrócito.

EXPERIMENTOS

Depois de concluir que o *AutoSimune* é capaz de fornecer experimentos que mostram resultados consistentes com a literatura médica, foi realizado experimentos que simulassem a infecção de células vermelhas do sangue por *Plasmodium Falciparum* demonstrando esse comportamento na circulação sanguínea, cérebro e no baço (GOMES *et al.*, 2016).

De modo a validar o ensaio, primeiramente, foram realizados experimentos para autenticar a simulação do comportamento dos eritrócitos e do *Plasmodium* e suas atuações nos ambientes virtuais (zonas). O *Experimento 1* foi realizado apenas com eritrócitos na ausência do agente etiológico, como pode ser observado na *figura 3*.

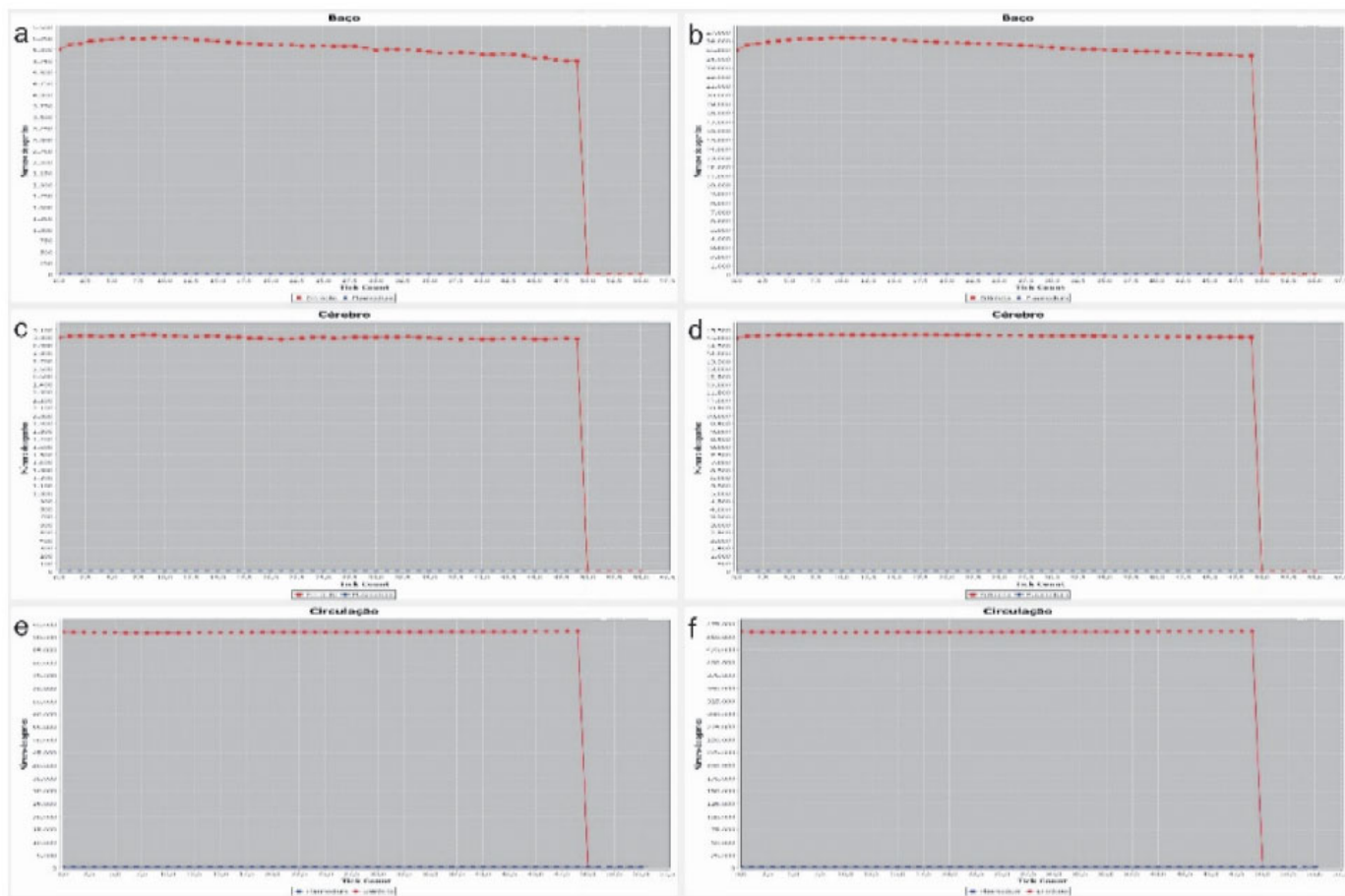


Figura 3: Experimento 1 - Simulação de eritrócito sem nenhum agente etiológico: Comportamento de eritrócito no baço nas contagens de 100 mil (a) e 500 mil (b). Comportamento de eritrócito no cérebro nas contagens de 100 mil (c) e 500 mil (d). Comportamento de eritrócito na circulação nas contagens de 100 mil (e) e 500 mil (f).

Nele, foram realizados 6 testes, onde é feito duplicata com números diferentes de eritrócitos – 100 mil e 500 mil – num contexto com três ambientes (zonas) – *baço*, *cérebro* e *circulação*. Com isso, pode-se observar que o número de eritrócitos fica constante ao longo de todo o seu tempo de vida – 50 ticks – na ausência de interferências externas, como a do patógeno da malária, tendo apenas leves alterações nas distribuições das células nas diversas zonas, o que demonstra que a circulação sanguínea é preservada sem perda celular.

O *Experimento 2* foi realizado sob uma ótica diferente, nesse caso, foram incluídos no sistema, apenas o agente *Plasmodium* na zona *Circulação*. Para tal, foi feita triplicata com diferentes contagens de agente – cinco, dez e vinte e cinco. Averiguou-se que na ausência de eritrócitos para serem infectados, não ocorre reprodução e expansão da quantia desses patógenos. Desse modo, o número de agentes permanece constante até que se encerre o seu tempo de vida – 5 ticks – demonstrado na *figura 4*.

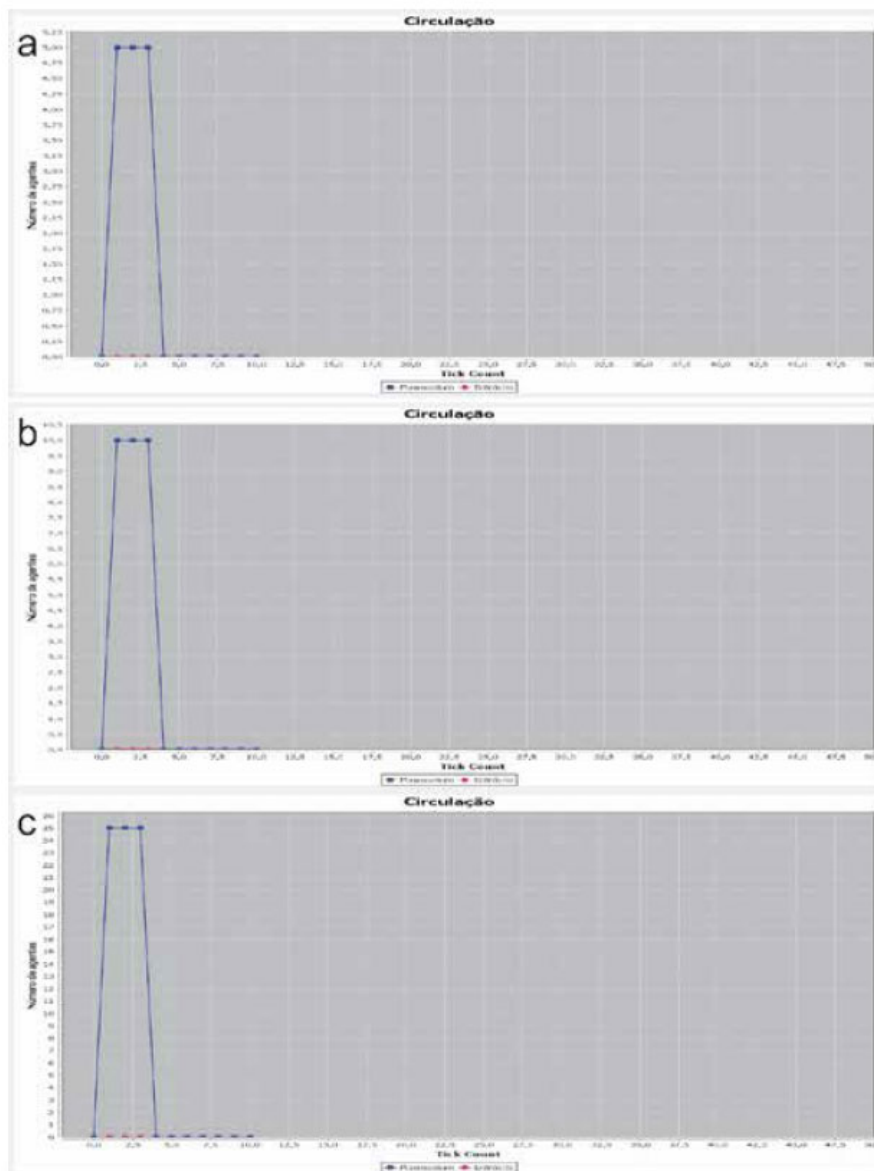


Figura 4: : Simulação do comportamento de Plasmodium na circulação com as contagens de 5(a), 10 (b) e 25 (c)

Esse ensaio pode ser analisado de duas formas, a primeira, corresponde a incapacidade de um merozoíta intra-hepático iniciar o ciclo eritrocítico na ausência de hemácias, no entanto, essa situação é inviável e incompatível com a vida humana. Entretanto, esse resultado pode ser pensando na perspectiva da ausência de receptores nas hemácias para certas espécies de *Plasmodium* (REY, 2008) como ocorre na malária por *P. vivax* que é dependente de receptores do sistema Duff.

Para o *Experimento 3* foi realizado a análise da interação *Plasmodium* e eritrócitos, num contexto em que as células vermelhas do sangue percorrem circulação, baço e cérebro. Para realizar tal simulação, partiu-se do conceito que o sangue humano apresenta cerca de 5.000.000 glóbulos vermelhos por mm^3 , com variações devido à idade e sexo. O esporozoíta de *Plasmodium falciparum* (que é a espécie mais virulenta, portanto escolhido para a simulação) tem seu ciclo de desenvolvimento no fígado e chega a produzir até o quinto ou sexto dias após a inoculação de esporozoítos, aproximadamente 40.000 esporozoítos (REY, 2008). A partir desse ponto, eles penetram nas células vermelhas do sangue e continuarão o ciclo biológico, estabelecendo a esquizogonia do sangue e liberando novos merozoítos, cada ciclo dentro de um intervalo de 36 a 48 horas. Neste momento - quando há a destruição das células vermelha e liberação dos novos agentes na circulação - existem pigmentos que agem como exógenos pirogênico, desencadeando a resposta imune e consequente produção e liberação de pirogênios endógenos (REY, 2008; SCHOLZEN; SAUERWEIN, 2016). Assim, a febre é um sinal característico da malária, conhecido por paroxismo febril (GOMES *et al.*, 2016).

Como nos seres humanos, o vetor *Anopheles spp.* geralmente inocula uma média de 20 esporozoítos, no final do ciclo hepático; pode-se obter quantitativos 800.000 merozoítos, considerando que cada esporozoíta que inicia o ciclo de esquizogonia do fígado aumentará para 40.000 merozoítos. Um ser humano tem cinco milhões de glóbulos vermelhos por microlitro de sangue, em um litro de sangue teria por volta de 5.000.000.000.000 (cinco trilhões) de glóbulos vermelhos; então em cinco litros (média volume de sangue considerado), teríamos um total de 25 trilhões de glóbulos vermelhos a serem infectados (GOMES *et al.*, 2016). Assim, temos uma relação de 1 *Plasmodium* para 31.250.000 eritrócitos, no entanto devido às limitações no simulador quanto ao número de agentes, a quantidade de eritrócitos precisou ser dividida por 1000, o que leva a um resultado mais acelerado. Tendo estabelecido a equivalência *Plasmodium* / eritrócito em 1:31.250, foi realizado um ensaio com 187.500 glóbulos vermelhos a serem infectados por seis parasitas. Como é demonstrado na *Figura 5* os resultados da simulação realizada mostram que a medida que a infecção avança, o número de parasitas aumenta e o de eritrócitos diminui. Tal achado se explica pelo rompimento e morte das células sanguíneas e pela liberação de novos *Plasmodium*.

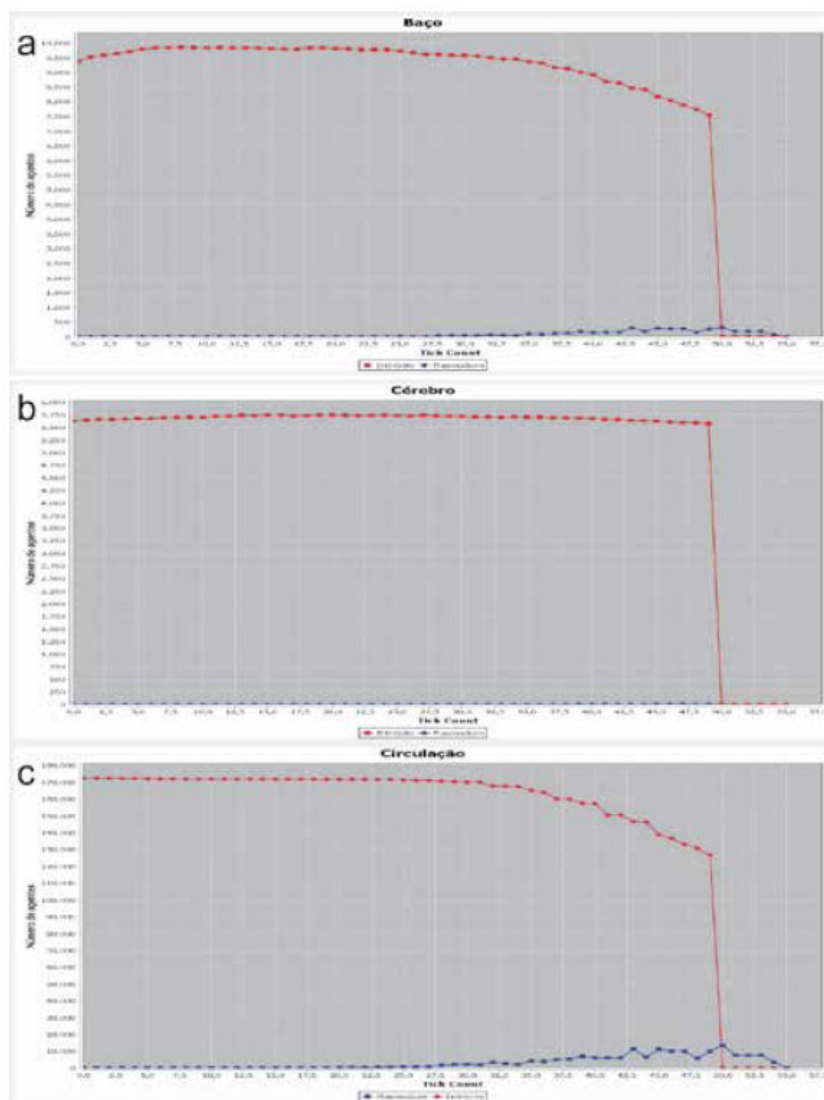


Figura 5: Simulação da infecção com $n = 187.500$ eritrócitos e $n = 6$ Plasmodium no baço (a), cérebro (b) e circulação (c).

Ao chegar no *Tick* 50, foi determinado que todas as hemácias seriam eliminadas, por alcançarem seu tempo máximo de vida. Com o desaparecimento dos eritrócitos, pode-se observar que os parasitas não conseguem se reproduzir e gerar novos agentes e, conseqüentemente, morrem após alcançar seu tempo máximo de vida (3 *Ticks*). O aprimoramento do *AutoSimmune* com o redimensionamento dos tempos de vida e das interações entre as células – protistas e hemácias – poderá aproximar, ainda mais, o modelo computacional dos eventos fisiopatológicos que ocorrem na malária falcípara.

PERSPECTIVAS

A malária é uma doença de grande abrangência, provocando a morte de centenas de milhares de pessoas por ano. Com efeito, o melhor entendimento dessa doença poderia significar uma contribuição imensa à humanidade. Grandes avanços aconteceriam em termos da prevenção, caso uma vacina fosse desenvolvida, ainda que tal empreitada seja bastante complexa, devido às diferentes formas evolutivas do *Plasmodium* (BUCHALLA *et al.*, 2003), com a participação de diferentes antígenos nos dispaes estágios do ciclo de vida do protozoário (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2012a).

Nesse âmbito, a experimentação *in silico* permite a testagem de novas hipóteses para o entendimento da fisiopatologia da moléstia, destacando-se que o *AutoSimmune* é ferramenta útil à simulação da malária, por tornar possível a realização de inúmeros ensaios em tempo hábil – sem os riscos associados à experimentação em animais humanos e não humanos –, o que poderá produzir avanços científicos.

Em um futuro próximo, espera-se aumentar o nível de complexidade nas simulações da infecção malárica no *AutoSimmune*, incluindo novas células, citocinas, entre outros, o que favorecerá e ampliará as possibilidades de estudos investigativos da malária.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Professor Rodrigo Siqueira-Batista, Laboratório de Agentes Patogênicos da Universidade Federal de Viçosa, pela leitura do texto e pelas sugestões apresentadas.

Referências Bibliográficas

1. BUCHALLA, C. M.; WALDMAN, E. A.; LAURENTI, R. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no Município de São Paulo. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 6, n. 4, p. 335–44, dez. 2003.
2. BUFFET, P. A. *et al.* The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. **Blood**, v. 117, n. 2, p. 381-392, 2011.
3. CHUA, Caroline Lin Lin *et al.* Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 26-34, 2013.
4. COURA J.R., editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
5. GOMES, Andréia Patricia *et al.* *Plasmodium falciparum* Infection: *In Silico* Preliminary Studies. **Abakós**, v. 5, n. 1, p. 63-83, 2016.
6. GOMES, Andréia Patricia *et al.* A infecção pelo gênero *Plasmodium*: epidemiologia, profilaxia e controle no Brasil. **Vittale - Revista de Ciências da Saúde**, v. 30, p. 47-58, 2018
7. NAGARAJ, V. A. *et al.* Malaria parasite-synthesized heme is essential in the mosquito and liver stages and complements host heme in the blood stages of infection. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.
8. POSSI, Maurílio A. Uma ferramenta para simulação do SI através de sistemas multiagentes: um caso de estudo da autoimunidade. 2012. 106f. Dissertação (Mestrado) — Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa.
9. REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
10. SIQUEIRA-BATISTA, R. *et al.* *Plasmodium Falciparum* malaria: proteomic studies. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, p. 394–400, 2012a.
11. WHITE N. J. *et al.*, Malaria. **Lancet**. v.383, n.9918, p.723-735, feb, 2014
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2017**. World Health Organization, 2017.

Autor correspondente

Ademir Nunes Ribeiro Júnior - junioranrj@gmail.com