

WORKSHOP NOVA/INSA de Doenças Transmitidas por Vetores



Definidos como todos os seres vivos capazes de transmitir um agente infeccioso, os vetores desempenham um papel fundamental na cadeia de transmissão das doenças transmissíveis. Estas ocorrem através da interação entre o agente infeccioso, o processo de transmissão – sendo este muitas vezes conduzido pelo vetor – e o hospedeiro. Doenças como a malária, o zika, a leishmaniose, o tifo, a doença de Lyme, entre outras, são transmitidas por vetores e têm um enorme impacto na mortalidade e morbidade das populações e nos sistemas de saúde dos países. A seguir aos mosquitos, as carraças são consideradas os mais importantes vetores de agentes patogénicos que causam doença nos humanos e nos animais. É pois essencial estudar os vetores e as suas rotas e sazonalidade, por forma a delinear medidas mais eficazes na prevenção e controlo destas doenças.

A NOVAsaúde, da Universidade NOVA de Lisboa, em parceria com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), organizaram o Workshop de Doenças Transmitidas por Vetores. O evento decorreu no dia 26 de setembro de 2016 nas instalações do INSA e contou com a participação de investigadores de ambas as instituições. Estas notas resumem os temas apresentados.

A primeira sessão contou com a participação de Sofia Núncio, do INSA, e de Henrique Silveira e Carla A. Sousa, ambos do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Os oradores realizaram breves apresentações das respetivas Instituições. O INSA é responsável pelo diagnóstico, vigilância e investigação na área dos vetores, especificamente de carraças e mosquitos. O

IHMT tem como missão contribuir para a erradicação das doenças transmitidas por vetores, com especial foco no estudo de mosquitos. O “REVIVE-carraças” é uma rede nacional de vigilância de carraças com os propósitos de caracterizar as espécies e sua sazonalidade, detetar e identificar agentes patogénicos, responder ao regulamento internacional, e definir níveis de alerta. O “Zikalliance, um esforço global para o controlo e prevenção do vírus Zika” é um programa multidisciplinar, financiado pelo Horizon 2020. Envolve mais de 50 instituições e 20 países diferentes e tem como principais objetivos medir o impacto do vírus na mulher grávida e nos recém-nascidos, decifrar e descrever a história do vírus nos humanos, e estabelecer uma rede de investigação colaborativa entre as Caraíbas, a América Central e do Sul, a África e a Europa.

A segunda e terceira sessão tiveram a apresentação de estudos e projetos desenvolvidos em ambas as Instituições. •

1. Silenciamento de Vitelogenina e Lachesina em *Rhipicephalus bursa*: impacto na sobrevivência e aquisição de infeção

A apresentação foi feita por Sandra Antunes. Teve como objetivo demonstrar a capacidade antigénica dos genes de vitelogenina e lachesina.

Limitações no desenvolvimento de vacinas anti-carraça devem-se, entre outras, à dificuldade de identificar moléculas cujo bloqueio não resulte em morte. Para contrariar este problema, os autores utilizaram um mo-

delo de estudo “*Rhipicephalus bursa* - *Babesia ovis*”, utilizando a espécie de carraça bursa infetada com a doença babesiose ovina¹.

Selecionaram quatro genes para estudos de RNA de interferência e verificaram que há uma influência da diminuição de expressão do gene *vitelogenina* na mortalidade e da *lachesina* na infecção. Estes genes com capacidade antigénica revelam-se como potenciais candidatos ao desenvolvimento de vacinas anti-carraça. •

2. Avaliação da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* de novos endoperóxidos

A segunda apresentação esteve a cargo de Lis Lobo. A sessão incidiu sobre a ação dos endoperóxidos no controlo e erradicação da malária.

O estudo avaliou a atividade antimalárica de novos endoperóxidos, na espécie *Plasmodium falciparum*², em amostras *in vitro* e *in vivo*. Utilizaram metodologias distintas em ambas as experiências³. Os resultados do estudo *in vitro* demonstram que o ensaio adotado foi eficaz na avaliação da suscetibilidade das duas estirpes de *P. falciparum* aos endoperóxidos em estudo. No estudo *in vivo*, três dos endoperóxidos testados tiveram efeito curativo numa dosagem de 50 mg/kg. Isto significa que os endoperóxidos podem ter um efeito eficaz na cura da malária. •

3. A investigação em rickettsioses e o seu impacto na Saúde Pública em Portugal

A terceira apresentação foi realizada por Rita de Sousa. Teve como principal objetivo alertar para a importância do estudo das rickettsias. A rickettsia, comumente chamada de carraça, provoca a maior parte das doenças nos humanos porque funciona como vetor e reservatório do agente. Através do programa REVIVE e do diagnóstico laboratorial realizado no INSA, a autora identificou carraças de corpo duro (nome científico: ixodídeos) colhidas no Homem, animais e vegetação em várias zonas do país.

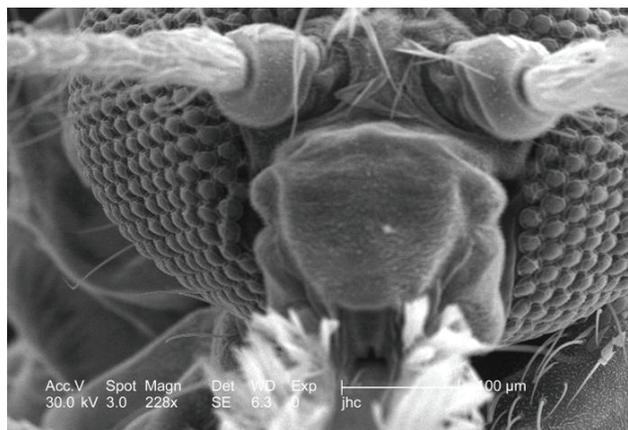
No total foram identificadas 8 espécies (*R. conorii*, *R. sibirica mongolitimona*, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoulti*, *R. aeschlimannii*) e destas, três estirpes foram identificadas a causar doença no Homem (*R. conorii*, *R. sibirica mongolitimona*, *R. slovaca*). •

4. Efeito larvicida de extratos de resíduos de café, em três espécies vetoras de malária

A quarta apresentação esteve a cargo de Flávia Ribeiro. Teve como objetivo exibir um composto inovador de combate a larvas de espécies de mosquitos que transmitem a malária.

Os mosquitos têm vindo a ganhar resistência aos inseticidas, em parte devido à sua vasta utilização, tornando-se essencial desenvolver novos métodos de combate aos vetores. A autora avaliou o efeito de destruição de extratos do café (polpa e bagas) em larvas de três espécies de mosquitos *Anopheles*⁴, as principais espécies vetoras de malária.

Os resultados indicam que existe um potencial efeito larvicida dos extratos de resíduos de café em algumas espécies *Anopheles*, e que o uso de produtos agroalimentares subvalorizados constitui uma alternativa viável e sustentável no controlo de vetores. •



©Phil CDC | Região anterior da cabeça do mosquito *Anopheles gambiae*

5. Dieta artificial complementada com um fator de sangue humano

A quinta apresentação esteve a cargo de Joana Marques. O objetivo da sessão foi explicar a importância de vários componentes do sangue animal e humano nas dietas artificiais.

A produção de mosquitos em laboratório apresenta alguns desafios quer ao nível da produção do próprio mosquito, quer éticos e de segurança. Para produzir ovos, o mosquito precisa de uma refeição com compostos idênticos ao sangue de um animal, mas que

¹A Babesiose é uma doença causada por hematozoários que afetam bovinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos e suínos. Os protozoários, membros do género *Babesia*, são transmitidos por carraças.

²Trata-se de um parasita protozoário, transmitido pela fêmea do mosquito *Anopheles*, que causa o tipo de malária mais perigosa e maligna.

³No caso da amostra *in vitro*, foi utilizado o ensaio *ring-stage survival assay* (RSA), e na amostra *in vivo* o ensaio *4-day suppressive test*, administrando um componente de 50mg/kg via oral a ratinhos.

⁴*Anopheles gambiae* Gilles, 1972 (África), *Anopheles stephensi* Liston, 1901 (Ásia), e *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (Europa).

são difíceis de obter nas refeições artificiais. Recentemente foi identificado um elemento no sangue humano (péptido) capaz de desencadear e regular a reprodução em fêmeas de *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*. A autora explicou o processo.

Os resultados preliminares revelaram (i) que o efeito deste péptido humano na fisiologia do mosquito estimulou uma resposta similar à obtida através de refeições sanguíneas; (ii) que o péptido humano induz a expressão do respectivo receptor presente no mosquito *in vitro* e *in vivo*; e (iii) que a sequência e estrutura do péptido humano comparada a péptidos presentes no mosquito revelou similaridade significativa entre estes, o que pode explicar a possível interação molecular péptido humano-receptor de mosquito. •

6. Uso de mosquitos modificados na prevenção de dengue

A sexta sessão foi realizada por Teresa Nazareth. A apresentação explicou como o estudo vai ser desenvolvido e implementado. A lacuna de medidas de prevenção e a resistência a inseticidas tornam doenças como o Dengue e a Zika desafios globais. A libertação de mosquitos geneticamente modificados, apesar de apresentar complexidades ambientais e éticas, assume-se como uma medida promissora.

O projeto irá recolher e sistematizar informação sobre o tema, construir uma ferramenta de medição de literacia pública, e explorar pontos de vista e opiniões dos membros da comunidade científica. •



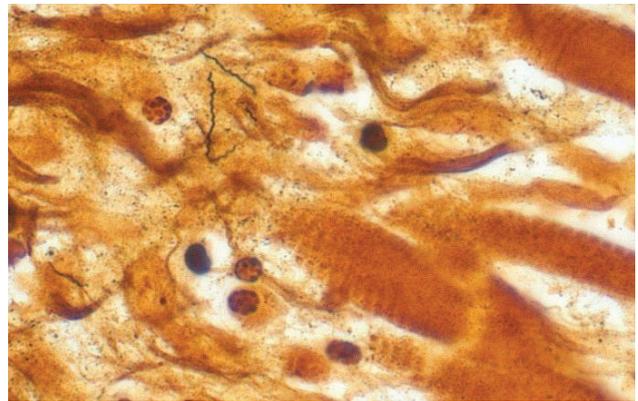
©Phil CDC | *Aedes aegypti*

7. O papel das aves na disseminação de *Borrelia burgdorferi* s.l.

A sétima apresentação esteve a cargo de Isabel Carvalho. Teve como propósito explicar a importância das aves na propagação de bactérias.

As aves têm um importante papel na disseminação e manutenção de *Borrelias*⁵ da espécie *burgdorferi*, devido à sua grande mobilidade, por serem hospedeiros da carraça vetor e potenciais reservatórios. Foram capturadas e analisadas aves com o objetivo de se encontrar carraças para estudo. Para isolar a bactéria, os investigadores realizaram biópsias e utilizaram metodologias específicas, nomeadamente para extração de DNA.

Neste estudo, detetou-se pela primeira vez as espécies *B. bissettii*, *B. miyamotoi* e *B. turdi* associadas a aves, sendo a *B. turdi* a que apresentou maior prevalência de infeção. Adicionalmente, foi possível confirmar a importância de *Turdus* sp. na manutenção de *B. valaisiana* e *B. turdi* na natureza. Apesar de não haver, até ao momento, qualquer associação de *B. turdi* a casos de infeção no Homem, o seu potencial patogénico deve ser esclarecido. •



©Phil CDC | *Borrelia burgdorferi*

8. Borrélias do complexo da febre recorrente identificadas em ixodídeos

A oitava sessão foi apresentada por Mónica Nunes. Teve como objetivo explicar as Borrélias e a sua adaptação a novos vetores. A bactéria *Borrelia* encontra-se distribuída em três complexos: *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl), associado à doença de Lyme (DL); o da Febre Recorrente (FR); e ainda o associado a répteis (cR). As borrélias do complexo Bbsl e do cR são normalmente transmitidas por ixodídeos, enquanto as espécies associadas à FR são transmitidas por carraças de corpo mole (nome científico argasídeos). No entanto, algumas destas espécies, tais como *B. theileri*, *B. miyamotoi* e *B. lonestari* têm-se adaptado a ixodídeos dos géneros *Rhipicephalus*, *Ixodes* e *Amblyomma*.

Recolheram-se ixodídeos em oito distritos de Portugal, os quais, após extração de DNA, foram sequenciados e analisados filogeneticamente. A par da presença de DNA de agentes da doença de Lyme, foram identificadas a espécie *B. miyamotoi* e duas possíveis novas espécies associadas à FR, transmitidas por ixodídeos.

⁵Género de bactéria da família das Treponemataceae, que só sobrevivem como parasitas de um organismo vivo (homem, roedor ou artrópode).

9. Flavivírus específicos de insetos: evolução e patogenicia

O nono trabalho foi apresentado Líbia Zé-zé. Teve como objetivo salientar a atual importância do estudo dos flavivírus, pelo desconhecimento do seu ciclo de vida e capacidade de mutação.

Os flavivírus englobam um grupo importante de vírus patogênicos para o Homem, tais como os vírus Zika, Dengue, e Febre-amarela. O grupo dos Flavivírus Específicos de Insetos (ISFVs) representa um subgrupo emergente de flavivírus crescentemente reportado em todo o mundo, e deverão constituir um ramo primordial de flavivírus apenas com capacidade de replicação em artrópodes.

No âmbito de projetos de vigilância de artrópodes, milhares de mosquitos fêmeas adultos foram pesquisados em *pool* (de 1 a 50 indivíduos) para a presença de RNA de flavivírus. O vírus Marim, isolado a partir de um pool de *Oc. Caspius*, foi totalmente sequenciado e caracterizado. Esta investigação identificou três tipos de ISFVs⁶ e permitiu verificar a possibilidade de o vírus Marim se desenvolver em ovos de galinha embrionados, além de células C6/36, onde se observou uma redução da transmissão do vírus West Nile em estudos de co-infecção e superinfecção.

A autora reportou haver desconhecimento sobre o ciclo de vida dos ISFVs e suas interações com outros flavivírus. A possibilidade de replicação em células de vertebrados tem sido excluída em estudos reportados. Os resultados obtidos para o vírus Marim indiciam que esta capacidade poderá existir. A evolução rápida verificada nos flavivírus com o desenvolvimento de estirpes com maior capacidade de infecção (por ex: a estirpe asiática do vírus Zika), coloca uma importância acrescida na investigação em flavivírus.

10. *Leishmania infantum* modula a extrusão de histona H1 em macrófagos caninos

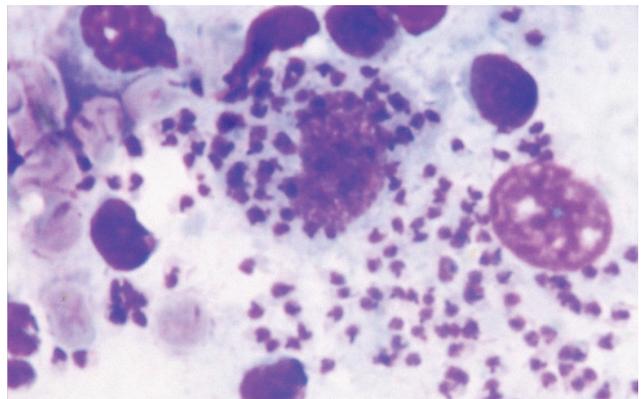
A décima sessão foi apresentada por Maria Pereira. Teve como objetivo explicar o processo biológico da infecção e a expulsão de histona.

Os neutrófilos⁷ desempenham um relevante papel na fase inicial da infecção por *leishmania infantum*⁸, que, através das suas armadilhas celulares fagotizam o parasita e transferem-no posteriormente para macrófagos, a célula hospedeira definitiva.

Em laboratório, os autores infetaram neutrófilos e macrófagos caninos com *leishmania infantum* por um lado, e cultivaram em macrófagos neutrófilos infetados e livres de parasitas por outro. Foram utilizadas como controlo negativo células não estimuladas e como controlo positivo células estimuladas por determinados genes (PMA, LPS ou IFN- γ). As células foram depois analisadas utilizando métodos específicos. A *L. infantum* modula negativamente a expulsão de Histona (H1)⁹ e DNA, evitando o possível efeito leishmanicida da histona e a consequente reação imunomediada.



©Phil CDC | mosquito *Aedes albopictus*



Leishmania infantum

As Notas dos Workshops são uma contribuição para a reflexão na área da saúde. Foram elaboradas por membros da equipa NOVAsaúde. As opiniões e posições podem não refletir as visões dos autores dos trabalhos apresentados na sessão realizada ou das entidades organizadoras, sendo qualquer erro ou omissão da exclusiva responsabilidade da NOVAsaúde.

A presente nota teve como redatora principal Inês Rego.

⁶Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (na Madeira), *Culex theileri*, e principalmente *Ochlerotatus caspius* (mas também *Cx. univittatus*, *Cx. theileri*, *Cx. pipiens* e *Oc. detritus*).

⁷São um sub-tipo de leucócitos ou células brancas, fazendo parte do sistema imunológico e sendo responsáveis pela defesa inicial do organismo contra bactérias e fungos.

⁸Doença infecciosa, não contagiosa, causada por parasitas do género *Leishmania*. Os parasitas vivem e multiplicam-se no interior das células que fazem parte do sistema de defesa do indivíduo, chamadas macrófagos.

⁹São as principais proteínas que compõem o nucleótideo (núcleo da célula).