



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LUANA KETLEN REIS LEÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
ELETROFISIOLÓGICAS DO TECIDO RETINIANO EM MODELO MURINO DE MALÁRIA
CEREBRAL INDUZIDO PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA**

Belém

Fevereiro/2015

LUANA KETLEN REIS LEÃO

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
ELETROFISIOLÓGICAS DO TECIDO RETINIANO EM MODELO MURINO DE MALÁRIA
CEREBRAL INDUZIDO PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Neurociências, como requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof. Dr^a. Karen Renata Matos
Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel
Herculano Oliveira da Silva

Belém

Fevereiro/2015

L433c Leão, Luana Ketlen Reis.

Caracterização da resposta inflamatória e alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas do tecido retiniano em modelo murino de malária cerebral induzido pela infecção por *Plasmodium Berghei* ANKA / Luana Ketlen Reis Leão – Belém/PA, 2015.

117 fls.: il. color.

Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de concentração: Neurociências. Linha de Pesquisa: Neurofisiologia da retina.

Orientadora: Prof. Dr^a Karen Renata Matos Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

1. Malária cerebral. 2. PBA. 3. Retinopatia. I. Oliveira, Karen Renata Matos. (Orient.) II. Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular– PNBC. III Título.

CDD 616.8

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária:

Andrea da Silva Reis: CRB – 11/436

LUANA KETLEN REIS LEÃO

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
ELETROFISIOLÓGICAS DO TECIDO RETINIANO EM MODELO MURINO DE MALÁRIA
CEREBRAL INDUZIDO PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA

Orientadora: Prof. Dr^a. Karen Renata Matos
Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel
Herculano Oliveira da Silva

Dissertação aprovada em 19 de fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Givago da Silva Souza - Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. José Luíz Fernandes Vieira - Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Belém, 19 de fevereiro de 2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroendocrinologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, com auxílio financeiro da FAPESPA (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Dedico esta dissertação,

Ao meu esposo e pais, Francis da Penha, Marlúcia Leão e Gervásio Leão que sempre me incentivaram e nunca deixaram eu desistir, mesmo nos dias mais difíceis. Por todo suporte estrutural e emocional, sempre me ensinando que precisamos travar grandes batalhas se pretendemos vencer a guerra, nunca esquecendo de ter fé nos planos de Deus. Por todo o amor, carinho, compreensão e companheirismo. É só mais um ciclo que se fecha e, ao mesmo tempo, outro que se inicia, porém com a certeza de que tudo dará certo, pois eu tenho vocês ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu tenha saúde, força de vontade e perseverança para levantar todos os dias disposta a trabalhar duro em busca dos meus sonhos.

A minha orientadora, Prof. Dr^a. Karen Renata Herculano Matos Oliveira, por acreditar que eu seria capaz de desenvolver este trabalho, sempre fazendo de tudo para que não faltasse nada, mesmo que isso significasse ir para bancada. Por dividir comigo as suas idéias, sempre me incentivando a ser uma profissional de qualidade. E por me mostrar que, apesar das adversidades e obstáculos, nunca devemos desistir dos nossos objetivos, lembrando que no final tudo valerá à pena.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos de laboratório, sempre contribuindo de forma positiva para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, Dr. Francisco Alves, Dr. Fernando Rocha, Dr. José Luíz Fernandes Vieira e Dr. Givago da Silva Souza, por todos as críticas e contribuições realizadas desde o plano até a defesa da minha dissertação de mestrados. Todas foram muito valiosas.

Ao meu irmão, Bruno Reis Leão, por sempre estar disposto a me ajudar quando eu preciso, mesmo que isso signifique me levar ou buscar na UFPA. Por ser essa pessoa incrível, que adora trabalhar com as crianças mais lindas desse mundo, ensinando

todos os dias o que mais ama. E por simplesmente ser o meu irmãozão que eu amo tanto.

A minha cunhada, Renata Nogueira, por todas as horas e horas de conversas, sempre ouvindo os meus dramas e sempre tendo um conselho sensato para me dar. E por simplesmente voltar a fazer parte dessa família, fazendo o meu irmão a pessoa mais feliz do mundo.

A toda a minha família, avós, tios, tias, primos e primas, que mesmo eu sendo muito ausente, sempre vibram com as minhas vitórias e fazem de mim uma pessoa orgulhosa por poder servir de exemplo para muitos de vocês. Amo vocês, por mais que eu não diga isso com frequência.

A minha nova família, Jonathan, Seu Francisco, Elizângela, Kauã, Kaio, Davi e Dona Virgínia. Por todos os momentos de descontração, apoio e companheirismo. Vocês são fundamentais em minha vida.

Aos colegas do LNE, por todos os seminários, dias de estudo, experimentos e prévias. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento e amadurecimento.

Às minhas parceiras “Renatetes”, Nayara, Liz e Paula, por todos os experimentos, horas de trabalho, choros, dramas, resultados, dias de estudos, discussões, risadas, brigas, estresses, cafés, almoços, lanches da tarde, lanches da noite e muitos outros que chegariam ao infinito. Eu agradeço absolutamente tudo que eu vivi com vocês e

tudo que vocês fizeram por mim nesses anos que nos conhecemos. Vocês representam a frase mais clichê, mas que eu tenho que dizer: “Sem vocês eu não teria conseguido”.

À minha amiga, Bruna Puty, que mesmo distante se manteve presente através de ligações via skype, mensagens, e-mail, vídeos, gravações de voz, sempre me aconselhando, apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos de graduação, Michelli, Josy, Luis e Chico, por sempre se fazerem presentes quando preciso, me fazendo lembrar que não importa quanto tempo passe, eu sempre poderei contar com a amizade, carinho e o amor de vocês.

Às pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, Carlos, Amarildo e Marcelo.

Ao professor Evander Batista, por todo o apoio e incentivo durante todos esses anos e por sempre me mostrar que devemos ter coragem para sermos quem nós somos.

A FAPESPA, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Muito obrigada a todos!

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

(Confúcio)

RESUMO

A malária cerebral (MC) é uma das complicações mais graves resultante da infecção por *P. falciparum* e a principal causa de morte em crianças. O quadro de MC apresenta uma patogênese complexa, associado a complicações neurológicas provenientes de uma resposta imunológica exacerbada, bem como eventos hemorrágicos. Estudos descrevem uma retinopatia associada ao quadro, juntamente com um intenso processo de astrogliose nas proximidades de vasos que nutrem o tecido retiniano. O presente trabalho buscou caracterizar o processo inflamatório e as possíveis alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas no tecido retiniano de camundongos albino suíço, quando inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Camundongos albino suíço foram infectados com cepa PbA. Para caracterização do quadro de malária cerebral experimental (MCE) foram avaliados diversos parâmetros, como surgimento dos sinais clínicos, curva de sobrevivência, parasitemia (%), ganho de massa corpórea, permeabilidade vascular e quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) no tecido cortical. Para avaliarmos alterações na funcionalidade do tecido retiniano, utilizamos eletrorretinograma de campo total. Para a avaliação dos sistemas de neurotransmissão foi realizado ensaio de liberação e captação de glutamato e GABA que, posteriormente foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para análise da resposta inflamatória foi realizada a quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) no tecido retiniano. Após a caracterização do quadro de MCE nós observamos a diminuição da amplitude de onda-b de cones e bastonetes, bem como aumento do tempo implícito de bastonetes, respostas mistas em diferentes intensidades e potencial oscilatório. Observamos aumento na liberação e captação de glutamato e, ainda, a ativação de uma via antiinflamatória no tecido retiniano. Este trabalho nos permitiu validar o modelo murino de MCE e caracterizar, pela primeira vez, alterações na funcionalidade do tecido retiniano, acompanhada de alterações no sistema glutamatérgico, bem como ativação de uma via antiinflamatória no tecido retiniano.

Palavras-chave: Malária cerebral; PbA; Retinopatia; Eletrorretinograma; Neuroquímica.

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is one of the most serious complications resulting from infection by *P. falciparum* and the leading cause of death in children. The CM frame has a complex pathogenesis associated with neurological complications arising in an enhanced immune response as well as hemorrhagic events. Studies describing retinopathy associated with the frame, together with an intense process of astrogliosis in the vicinity of retinal vessels that nourish the tissue. This paper sought to characterize the inflammatory process and the possible neurochemical and electrophysiological changes in the retinal tissue of Swiss albino mice, when inoculated with *Plasmodium berghei* ANKA strain (PbA). Swiss albino mice were infected with PbA strain. To characterize the above experimental cerebral malaria (ECM) was evaluated several parameters, such as onset of clinical signs, survival curves parasitemia (%) and body mass gain, vascular permeability and quantification of cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) in the cortical tissue. To evaluate changes in retinal tissue functionality, use full-field electroretinography. For the evaluation of neurotransmitter systems release assay was performed and uptake of glutamate and GABA which was then quantified by High Performance Liquid Chromatography. The inflammatory response analysis was performed to quantify the cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-10) in retinal tissue. After characterizing the MCE framework we observe a reduction in the amplitude of b-wave of rods and cones, as well as increase the implicit time of rods, mixed responses at different intensities and oscillatory potential. We observed an increase in the release and glutamate uptake and also the activation of an anti-inflammatory pathway in retinal tissue. This study allowed us to validate the murine model of MCE and characterize for the first time, changes in the retinal function accompanied by changes in the glutamatergic system as well as activation of the inflammatory pathway in retinal tissue.

Keywords: Cerebral malaria; PbA; Retinopathy; Electroretinogram; Neurochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.c	Antes de cristo
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ANKA	ANtwerpen-KAsapa
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
BHR	Barreira hematorretiniana
BSA	Albumina Bovina Sérica
Ca²⁺	Íon Cálcio
cd.s/m²	Candela segundos por metro quadrado
CEUA	Comissão de ética do uso de animais
Cl⁻	Cloreto
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMF	Meio Livre de Cálcio e Magnésio
Dr	Doutor
d.p.i	Dias pós-infecção
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatório
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ERG	Eletrorretinograma
ffERG	Eletrorretinograma de Campo Total
GABA	Ácido Gama-aminolbutírico (Gamma-AminoButyric Acid)
GLAST	Transportador de aspartato-glutamato
GLT-1	Transportador de Glutamato Glial 1

Glu	Glutamato
GMPc	Cyclic Guanosine Monophosphate
H₂O_d	Água destilada
HE	Hematoxilina e Eosina
HEPES	N (2-hidroxiethyl) piperazina-N ¹ - (ácido 2-etanossulfônico)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Peroxidase de purificada
Hz	Hertz
i.p	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
K⁺	íon Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
Log	Logaritmo
LT	Lifotoxina
MC	Malária Cerebral
MCE	Malária cerebral experimental
MCE-	Malária Cerebral Experimental negativo
MCE+	Malária Cerebral Experimental positivo
M-CSF	Fator de formação de colônias de macrófagos

mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
ml	Mililitro
ms	Milissegundo
Na⁺	Íon sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	Ortoftaldeído
P.A	Metanol absoluto
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformolaldeído
PfEMP1	Proteína de membrana do eritrócito 1 de <i>Plasmodium Falciparum</i>
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogénio
PHEN	Fenantrolina
PIPES	Sal dissódico piperazina -1,4 -bis (2-ácido etanossulfónico)
rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	Tetrametilbenzidinha
TNFR2	Receptores de TNF- α tipo 2

TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TWEEN	Polissorbato surfactante
UFPA	Universidade Federal do Pará
WHO	World Health Organization
μl	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária. Fonte: WHO, 2014.....28
- Figura 2:** Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil. Fonte: SINAN/SVS/MS e SIVEP-Malária/SVS/MS.....28
- Figura 3:** Ciclo evolutivo do *Plasmodium sp.* em seus hospedeiros, invertebrado (mosquito) e vertebrado (homem). (A) Infecção do hospedeiro vertebrado; (B) Fase pré-eritrocítica; (C) Fase eritrocítica; (D) Infecção do hospedeiro invertebrado. Fonte: Adaptado de White et al., 2014.....32
- Figura 4:** Desenho esquemático das formas evolutivas do *Plasmodium falciparum* na fase eritrocítica. Fonte: Adaptado de Tuteja, 2007.....32
- Figura 5:** Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* na microvasculatura cerebral, elucidando a obstrução de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, hipóxia do tecido. Fonte: Adaptado de Chen et al., 2000.....35
- Figura 6:** Mecanismos envolvidos na degeneração do endotélio vascular e astrócitos no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de Combes et al., 2006.....38

Figura 7: Manifestações clínicas observadas em pacientes com o quadro de malária cerebral. (A) Presença de papiloedema; (B) Embranquecimento retiniano; (C) Descoloração dos vasos sanguíneos. Fonte: Adaptado de Beare et al., 2006.....43

Figura 8: Desenho esquemático da equação utilizada para obtenção da porcentagem de parasitemia.....53

Figura 9: Desenho esquemático do Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia utilizado (CLAE) nos experimentos.....58

Figura 10: Desenho esquemático dos equipamentos de Eletrorretinograma (ERG) utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho.....60

Figura 11: Desenho esquemático do registro obtido pelo Eletrorretinograma (ERG) e exemplificação dos parâmetros avaliados em cada registro.....63

Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos albinos suíços infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais).....66

Figura 13: Fotomicrografias de distensões sanguíneas coradas com Giemsa (1000x). **A:** Controle; **B:** MCE no 3º d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios

eritrocíticos do protozoário; **C:** MCE no 7º d.p.i. As setas marcam o aumento da parasitemia, bem como, alterações estruturais e morfológicas das células sanguíneas comumente infectadas pelo parasita.....68

Figura 14: Evolução da parasitemia de camundongos albinos suíços infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais). * MCE vs MCE-; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$69

Figura 15: Avaliação do ganho de massa corpórea de camundongos albinos suíços controle e infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados ou PBS, apresentando três grupos experimentais: Controle (PBS); MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n= 13 animais).....70

Figura 16: Incidência do quadro de MCE no grupo de camundongos albinos suíços controle e infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: Controle; MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais).....72

Figura 17: Ensaio de Permeabilidade Vascular pelo uso do corante Azul de Evans. **A:** Ausência de extravasamento vascular no cérebro de camundongos controle (PBS); **B:**

Ausência de extravasamento vascular no cérebro de camundongos infectados que não desenvolveram o quadro de MCE (MCE-); **C:** Presença de extravasamento vascular no cérebro de camundongos infectados com a cepa PbA.....73

Figura 19: Ensaio de Permeabilidade Vascular pelo uso do corante Azul de Evans. **A:** Ausência de microhemorragias no cérebro de camundongos controle (PBS); **B:** Microhemorragias em cérebros de camundongos albino suíço infectados com a cepa PbA. A seta marca a presença de focos hemorrágicos caracterizando o extravasamento vascular no grupo MCE.....74

Figura 20: Concentração de TNF- α no cérebro de camundongos albino suíços no 7^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).....76

Figura 21: Concentração de IL-6 no cérebro de camundongos albino suíços no 7^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).....76

Figura 22: Concentração de IL-10 no cérebro de camundongos albino suíços no 7^o dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).....77

Figura 23: Concentração de TNF- α na retina de camundongos albino suíços no 7^o dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o

quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão.....79

Figura 24: Concentração de IL-6 na retina de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão.....80

Figura 25: Concentração de IL-10 na retina de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....81

Figura 26: Liberação de glutamato no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....83

Figura 27: Liberação de GABA no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão.....84

Figura 28: Captação de glutamato no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE ou MCE- vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....85

Figura 29: Amplitude de resposta do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-b de resposta isolada de bastonete; (B) onda-b de resposta mista 1; (C) onda-a de resposta de mista 3; (D) onda-b de resposta mista 3; (E) onda-a de resposta isolada de cone; (F) onda-b de resposta isolada de cone. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; $p < 0.05$ (Teste *t Student*).....88

Figura 30: Tempo implícito de resposta isolada de bastonete do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE+ vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....89

Figura 31: Tempo implícito de resposta mista (bastonete e cone) do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-a de resposta mista 1; (B) onda-b de resposta de mista 1; (C) onda-a de resposta mista 3; (D) onda-b de resposta mista 3. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE+ vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....90

Figura 32: Tempo implícito de resposta isolada de cone do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-a de resposta de cone (B) onda-b de resposta de cone. Dados expressos pela média dos grupos.....91

Figura 33 Avaliação do tempo implícito de resposta de potencial oscilatório do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).....91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 Considerações gerais.....	26
1.2 Aspectos Clínicos da Malária.....	29
1.3 Patogênese da Malária Cerebral.....	33
1.4 Modelo Murino de Malária Cerebral.....	39
1.5 Retinopatia Associada à Malária Cerebral.....	41
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Animais experimentais.....	51
3.2 Cepa de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA e Indução da Malária Cerebral Experimental.....	51
3.3 Caracterização do Quadro de Malária Cerebral Experimental, Curva de Sobrevivência e Parasitemia.....	52
3.4 Permeabilidade vascular.....	54
3.5 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA.....	54
3.6 Quantificação de glutamato e GABA.....	56
3.7 Dosagem de Proteína.....	58
3.8 Eletrorretinograma.....	59
<u>3.8.1 Equipamentos.....</u>	59
<u>3.8.2 Procedimentos.....</u>	60
<u>3.8.3 Mensuração dos componentes ffERG.....</u>	63

3.9 Análise Estatística.....	63
4 RESULTADOS.....	65
4.1 Caracterização do Quadro de Malária Cerebral Experimental.....	65
4.1.1 Curva de Sobrevivência e Sinais Clínicos.....	65
4.1.2 Parasitemia e Avaliação da massa corpórea.....	67
4.1.3 Permeabilidade vascular pelo uso do corante Azul de Evans	71
4.2 Níveis de TNF- α , IL-10 e IL-6 no Córtex e na Retina de camundongos albino suíço infectado com cepa PbA.....	75
4.3 Efeito da Malária Cerebral Experimental sobre a liberação de glutamato e GABA e captação de glutamato.....	82
4.4 Avaliação das Respostas Eletroretinográficas no quadro de Malária Cerebral Experimental.....	86
5 DISCUSSÃO.....	92
6 CONCLUSÃO.....	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A malária é uma doença infecciosa aguda descrita por Hipócrates no século V a.c. O termo malária deriva do italiano “*mal’aria*”, que significa “ar ruim”. Essa terminologia surgiu no século XVIII quando as manifestações da doença eram atribuídas ao ar contaminado de regiões pantanosas (Haldar et al., 2007; Tuteja, 2007).

No século XIX, o médico patologista Charles Alphonse Laveran demonstrou que a infecção era desencadeada por parasitas protozoários, que posteriormente, o médico britânico Ronald Ross mostrou ser transmitido pela picada de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* (Tuteja, 2007). Dados da literatura apontam que mais de 400 espécies de *Anopheles* já foram descritas, sendo que 60 são vetores deste parasita em condições naturais (Tuteja, 2007).

O agente etiológico pertence ao gênero *Plasmodium*, sendo que mais de 100 espécies são capazes de infectar diversos grupos de vertebrados, como répteis, aves e mamíferos, porém apenas cinco podem infectar o homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium falciparum* (Kantele & Jokiranta, 2011; McKenzie et al., 2008; Miller et al., 2002; Tuteja, 2007; White et al., 2014).

Dentre as espécies infectantes para o homem *P. ovale* é o menos comum, encontrado apenas na região ocidental da África, enquanto que *P. malariae* possui ampla distribuição, porém baixa incidência. As infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* são os mais comuns, capazes de ocasionar anemia severa. Contudo apenas *P. falciparum* pode gerar o quadro mais grave da doença, tornando-a potencialmente fatal (Idro et al., 2005; Snow et al., 2005; Sullivan et al., 2010; Tuteja, 2007).

Considerada como uma das principais endemias mundiais e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações, a malária apresenta taxas de morbidade e mortalidade semelhantes a de outras doenças infecciosas como tuberculose e HIV/AIDS (Hunt et al., 2006; Martins et al., 2009). Dados epidemiológicos recentes registraram 216 milhões de casos por ano com mais de 500 mil mortes, principalmente de crianças abaixo dos cinco anos de idade (Idro et al., 2005; Snow et al., 2005; Sullivan, 2010; WHO, 2011). Embora o continente africano detenha 90% dos casos, a malária apresenta ampla distribuição em áreas de transmissão localizadas na Ásia (Subcontinente Indiano, Sudeste Asiático e Oriente), Europa, América central (México) e América do Sul (WHO, 2014) (Figura 1).

No Brasil, 99,7% dos casos de malária registrados encontram-se na região Amazônica. Dentre os estados desta região, o Amazonas, Rondônia e Pará somam mais de 85% dos casos (Figura 2) (Braz et al., 2013; Kirchgatter & Del Portillo., 2005). Cerca de 600 mil casos clínicos de malária foram registrados entre 1996 e 2000, reduzindo para 400 mil nos anos seguintes (Kirchgatter & Del Portillo, 2005). Contudo, a incidência manteve-se até 2010, mostrando que não houve diminuição efetiva da incidência da doença (Braz et al., 2013). No Pará, o número de casos registrados entre 2003 e 2011 indica que a ocorrência da doença continua aumentando, apresentando aumento de 3,43% no índice de risco de contrair a malária (Junior et al., 2014).

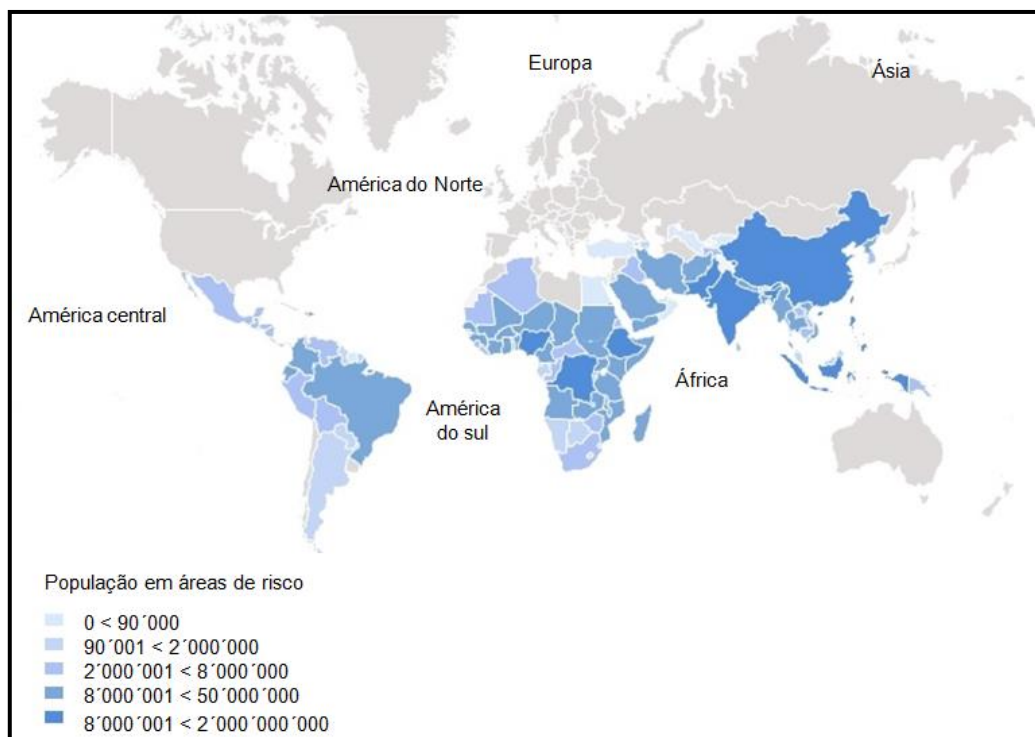


Figura 1: Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária.

Fonte: WHO, 2014.

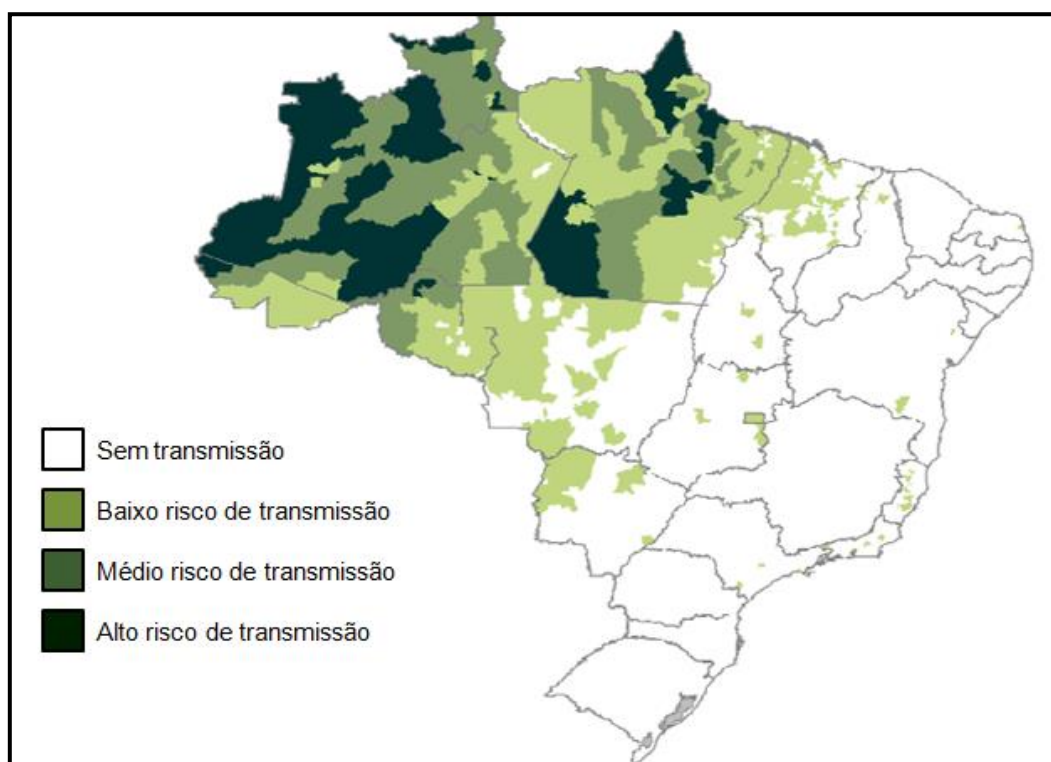


Figura 2: Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no

Brasil. Fonte: SINAN/SVS/MS e SIVEP-Malária/SVS/MS.

A dificuldade em diagnosticar, a migração de indivíduos para áreas endêmicas, o uso de tratamentos ineficientes, a resistência do parasita aos antimaláricos e o nível de desenvolvimento socioeconômico da região representam os principais fatores que tornam a malária um problema público mundial e de difícil erradicação (Sachs & Malaney, 2002; Miller et al., 2002; Walther & Walther, 2007).

1.2 Aspectos clínicos da Malária

O ciclo evolutivo do *Plasmodium* é complexo, apresentando estágios intracelulares e extracelulares que garantem a rápida progressão da doença. Este ciclo é dividido em duas fases: a fase assexuada, no hospedeiro vertebrado (homem) e fase sexuada, no hospedeiro invertebrado (mosquito) (Boysen et al., 2013; Haldar et al., 2007; Miller et al., 2002; Tuteja, 2007).

A infecção do hospedeiro vertebrado inicia-se com a inoculação do parasita na corrente sanguínea, sob a forma de esporozoíto, pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Este processo dá início à fase assexuada do ciclo que consiste em duas etapas: a etapa pré-eritrocítica e a eritrocítica (Haldar et al., 2007; Tuteja, 2007).

Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram para o fígado e infectam os hepatócitos, caracterizando a fase assexuada pré-eritrocítica (Miller et al., 2002; Mota et al., 2001; Tuteja, 2007). Nos hepatócitos, os esporozoítos proliferam por 2 a 10 dias dependendo da espécie, dando origem a vários merozoítos. Durante esse período, a infecção é assintomática e cada esporozoíto pode produzir cerca de 30.000 merozoítos por hepatócito infectado (Mota et al., 2001). Em seguida, os hepatócitos se rompem e os merozoítos liberados retornam a corrente sanguínea e invadem os

eritrócitos (glóbulos vermelhos ou hemácias) iniciando a fase assexuada eritrocítica do ciclo (Figura 3) (Miller et al., 2002).

Apesar de ser fundamental para o ciclo, o mecanismo pelo qual o parasita invade os hepatócitos ainda não se encontra bem elucidado (Mota et al., 2001). Contudo, Frevert et al., (1993) sugere que a interação entre parasita e hepatócito ocorre devido a presença de receptores específicos na superfície do *Plasmodium* capazes de reconhecer proteoglicanos localizados na membrana celular dos hepatócitos.

Durante a fase assexuada eritrocítica, os merozoítos passam por três diferentes estágios: anel, trofozoíto e esquizonte (Figura 4). O primeiro estágio apresenta o trofozoíto jovem, caracterizado pela disposição estrutural em forma de anel. O segundo estágio apresenta o trofozoíto maduro, formado pelo aumento da atividade metabólica, a partir da ingestão do citoplasma eritrocítico, e proteólise da hemoglobina. O último estágio consiste na formação de esquizonte, ocasionado por vários ciclos celulares sem divisão da célula (Tuteja, 2007; White et al., 2014). Cada esquizonte possui aproximadamente 20 merozoítos que são liberados na corrente sanguínea após o rompimento da membrana do eritrócito. Esta fase coincide com os acessos febris comumente apresentados durante a evolução da doença (Tuteja, 2007; White et al., 2014).

Após uma série de ciclos eritrocíticos, por um processo ainda desconhecido, parte dos merozoítos que não invadem os eritrócitos se diferencia em micro e macrogametócitos (fêmea e macho, respectivamente), a forma infectante para o mosquito. Os gametócitos são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante a picada de um hospedeiro vertebrado infectado, iniciando assim a fase sexuada do ciclo. Os

gametas, feminino e masculino, se fundem na parede do intestino do hospedeiro invertebrado formando o zigoto. Estes evoluem para oocistos dando origem a esporogonia. O oocisto se rompe liberando esporozoítos que migram até a glândula salivar para então serem transmitidos ao hospedeiro vertebrado, onde o ciclo se reinicia (Figura 3) (Eksi et al., 2006; Baker et al., 2010).

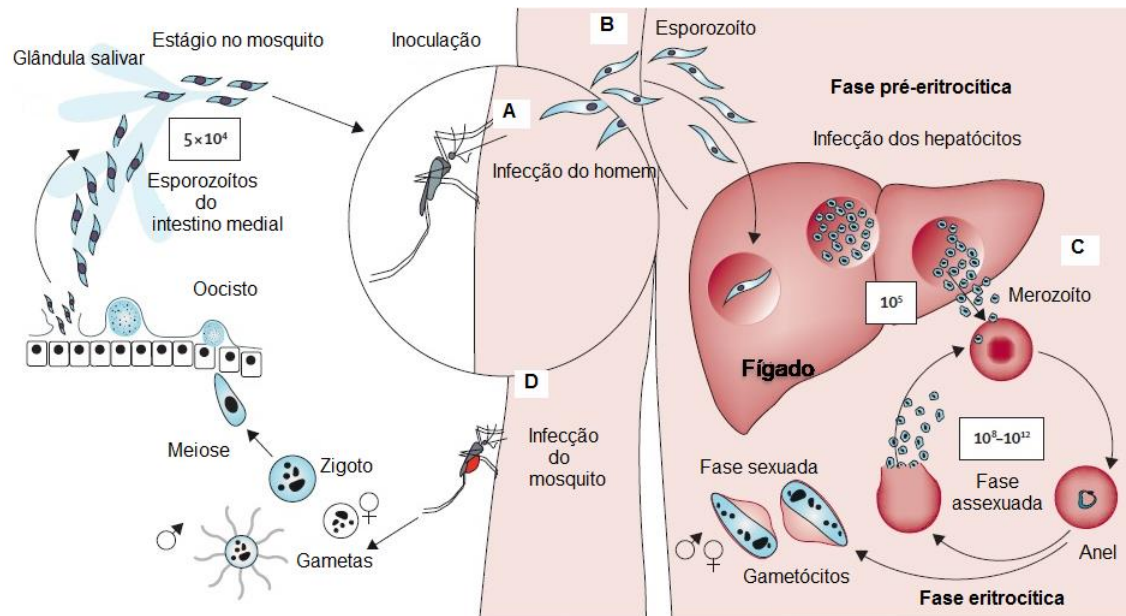


Figura 3: Ciclo evolutivo do *Plasmodium* sp. em seus hospedeiros, invertebrado (mosquito) e vertebrado (homem). (A) Infecção do hospedeiro vertebrado; (B) Fase pré-eritrocítica; (C) Fase eritrocítica; (D) Infecção do hospedeiro invertebrado. Fonte: Adaptado de White et al., 2014.



Figura 4: Desenho esquemático das formas evolutivas do *Plasmodium falciparum* na fase eritrocítica. Fonte: Adaptado de Tuteja, 2007.

Os primeiros sintomas clínicos da malária são inespecíficos, iniciados a partir da ruptura dos eritrócitos parasitados, que liberam antígenos na corrente sanguínea, ativando a resposta imunológica do hospedeiro (De Souza & Riley, 2002). Dentre eles, destacam-se os episódios febris, cefaléia, fadiga, mal-estar, dores abdominais, náuseas e vômitos. Em infecções ocasionadas por *P. falciparum*, este quadro pode evoluir para forma mais grave da doença, caracterizada por convulsões que podem desencadear um quadro de coma e morte, comumente denominada de malária cerebral (MC) (Good et al., 2005; White et al., 2014). Essa desordem neurológica ocorre em 1% dos casos registrados, sendo capaz de provocar em torno de 2 milhões de mortes por ano no mundo (Carvalho et al., 2014; Combes et al., 2006; Hunt & Grau 2003; Martins et al., 2009a; Medana & Turner, 2006; Miller et al., 2002).

1.3 Patogênese da Malária Cerebral

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a MC é uma encefalopatia com estado de coma associado a desordens neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos (Lou et al., 2001). Os pacientes que sobrevivem à doença apresentam complicações neurológicas permanentes como desordens de cognição e fala, anormalidades motoras e cegueira cortical (Bondi, 1992; Schofield et al., 2005). Contudo, o desenvolvimento da patogênese da MC ainda é pouco compreendido, sendo propostas duas teorias que buscam elucidar seus mecanismos (Berendt et al., 1994; Carvalho et al., 2014; Combes et al., 2006; Hunt & Grau 2003; Martins et al., 2009a; Medana & Turner, 2006; Miller et al., 2002).

A primeira delas, a teoria da obstrução mecânica, proposta por Marchiafava & Bignami (1894), postula que a malária cerebral é consequência de um quadro de

hipóxia cerebral ocasionado pelo bloqueio do fluxo sanguíneo decorrente da aderência de eritrócitos parasitados no endotélio vascular cerebral (Figura 5) (Idro et al., 2005; Miller et al., 2002).

Por outro lado, a teoria da inflamação, proposta por Maegraith (1948), sugere que a MC é ocasionada a partir de uma resposta inflamatória exacerbada, iniciada com a ativação dos monócitos, induzindo-os a secretar mediadores pró-inflamatórios, como interleucinais (IL), fator de formação de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α) e linfotoxinas (LT) (Nebl et al., 2005).

Ao longo dos anos as duas teorias vêm sendo extensivamente discutidas e devido a complexidade da doença, alguns estudos sugerem a conjunção das hipóteses para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela patogênese da MC (Hayder et al., 2006).

A patologia associada à MC apresenta aspectos complexos e multifatoriais. Dentre esses aspectos destaca-se o mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral que depende da interação de antígenos presentes na superfície dos eritrócitos parasitados (PfEMP1) com receptores do hospedeiro, como CD36, CD54 e ICAM-1 (Turner et al., 1994). No cérebro, a aderência dos eritrócitos no endotélio pode levar a processos isquêmicos com surgimento de hemorragias petequiais, sendo os principais responsáveis pelo estado de coma na MC (Berendt et al., 1994). Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α promove o aumento da expressão de ICAM-1, potencializando o sequestro de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas, diminuindo a irrigação e oxigenação de vários órgãos do corpo, inclusive o cérebro (Figura 5) (Hunt & Grau, 2003; Idro et al., 2005; Ma et al., 1997; Miller et al., 2002).

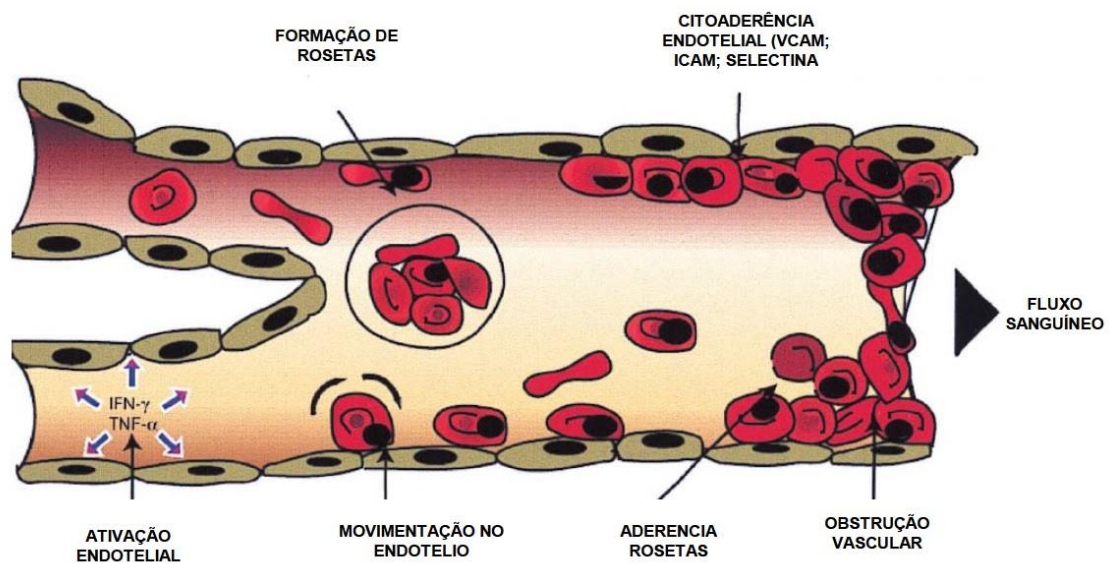


Figura 5: Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* na microvasculatura cerebral, elucidando a obstrução de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, hipóxia do tecido. Fonte: Adaptado de Chen et al., 2000.

No Sistema Nervoso Central (SNC), a MC induz danos na estrutura da Barreira Hematoencefálica (BHE), possibilitando que antígenos e mediadores inflamatórios entrem no parênquima cerebral, resultando na ativação da microglia, danos neuronais e redistribuição de células astrocitárias (Adams et al., 2002; Ma et al., 1997; Medana et al., 2001; Hunt & Grau, 2003).

Os astrócitos são importantes na manutenção das propriedades da BHE no endotélio vascular. A degeneração de astrócitos é uma das principais consequências da patologia da MC que contribuem para alteração conformacional da BHE e disfunção do SNC (Figura 6), inclusive no tecido retiniano, onde se destaca o desenvolvimento de uma retinopatia acompanhada da perda de acuidade visual (Lochhead et al., 2010; Medana et al., 2001).

Estudos vêm ratificando que o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias também constitui um evento fundamental para o desenvolvimento e estabelecimento da MC (Brown et al., 1999; Hunt & Grau, 2003). Dentre essas citocinas, destaca-se o TNF- α secretado por macrófagos e células T CD4+. A produção de TNF- α na fase inicial da MC parece estar relacionada à redução na carga parasitária. No entanto, a excessiva produção desta citocina na fase mais tardia está associada à severidade da doença (Omer et al, 2000). Esse papel divergente do TNF- α sugere que a regulação e o tempo de produção de citocinas pró-inflamatórias são de fundamental importância para o controle da infecção (Omer et al, 2000).

A liberação de citocinas antiinflamatórias, principalmente interleucina 10 (IL-10) possui papel protetor regulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao parasito. Kossodo et al. (1997) demonstraram que a neutralização *in vivo* da IL-10 induz o aparecimento da síndrome neurológica em animais que antes eram

resistentes a MC, sugerindo que esse mecanismo de proteção via liberação de citocinas anti-inflamatórias pode ser deficiente em indivíduos susceptíveis ao quadro de MC. Neste contexto, o desajuste entre o processo de liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias parece ser crucial para o desenvolvimento da MC (Lacerda-Queiroz et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos nas alterações da BHE, obstruções microvasculares, degeneração de astrócitos, bem como na homeostasia dos sistemas de neurotransmissores, associado ao desenvolvimento da MC ainda permanecem pouco compreendidos.

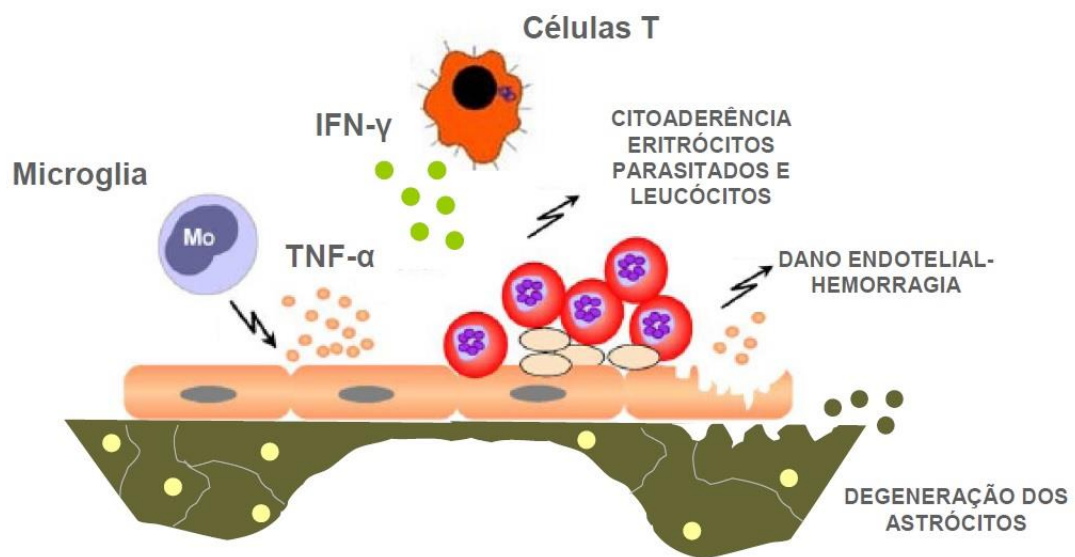


Figura 6: Mecanismos envolvidos na degeneração do endotélio vascular e astrócitos no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de Combes et al., 2006.

1.4 Modelo Murino de Malária Cerebral

Ainda que diversos estudos busquem caracterizar os mecanismos pelos quais a MC se desenvolve, pouco se sabe sobre sua patogênese (Combes et al., 2005; Lamb et al., 2006). Neste contexto, modelos experimentais em animais vêm sendo desenvolvidos devido às dificuldades de se acompanhar e avaliar as características patológicas nos portadores de MC humana.

Dentre os principais modelos experimentais, o modelo murino é um dos mais estudados por apresentar muitas similaridades com a MC em humanos, principalmente com relação à resposta imunológica (Hunt & Grau, 2003). A utilização de diferentes linhagens de camundongos, bem como diferentes espécies de *Plasmodium* esclarecem muitos mecanismos moleculares envolvidos no quadro da MC (de Souza & Riley, 2002). As espécies infectantes para roedores são naturais da África e pertencem ao subgênero *Vinckeia*. Existem cinco espécies capazes de infectar roedores: *Plasmodium atheruri*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium berghei* (Wheeler et al., 2000).

Dentre estas apenas *P. berghei* e *P. yoelii* são capazes de induzir o quadro de MC experimental. A maioria dos estudos relacionados à MC provém do modelo de infecção por *P. berghei*, por melhor reproduzir as características observadas na MC humana (Lou et al., 2001).

Na década de 60, cepas foram obtidas a partir do isolamento do parasita de um único hospedeiro natural. Dentre as cepas obtidas, duas são mais importantes, a cepa NK 65 de *P. berghei* isolada em um exemplar de *Anopheles durenii* e a cepa ANKA isolada na mesma espécie. A cepa de *P.berghei* ANKA (PbA) é mais utilizada nos modelos experimentais de MC por ativar o sequestro de células na microcirculação,

desencadeando em baixa parasitemia uma infecção letal que evolui rapidamente para um quadro de malária cerebral (Lou et al., 2001).

As diferentes linhagens de camundongos também exibem uma resposta diferencial às espécies de *Plasmodium*. Em níveis idênticos de parasitemia durante a fase aguda da infecção, algumas linhagens de camundongos são potencialmente susceptíveis ao desenvolvimento do quadro de MC, enquanto que outras são resistentes. Dentre as linhagens susceptíveis, destacam-se os camundongos CBA/J, C57Bl/6, DBA/1 e albino suíço e dentre as linhagens resistentes, os camundongos BALB/C e A/J (Lou et al., 2001; Martins et al., 2009b).

A infecção de linhagens de camundongos susceptíveis acarreta o desenvolvimento da MC, apresentando os principais sinais clínicos da doença, como ataxia, alterações respiratórias e coma (de Souza & Riley, 2002). O tempo para aparecimento desses sinais varia de acordo com o perfil genético do hospedeiro e a cepa utilizada, porém normalmente surgem entre 5-10 dias pós-infecção (de Souza & Riley, 2002). Estudos histopatológicos demonstraram a ocorrência de obstrução de vasos, surgimento de hemorragias e a migração e aderência de leucócitos no endotélio vascular cerebral. Modelos resistentes inoculados com o mesmo inóculo não desenvolveram a MC, morrendo com 21 dias pós-infecção apresentando quadro de anemia e hiperparasitemia (Neill & Hunt, 1992).

Recentemente, camundongos da linhagem albino suíço demonstraram ser um bom modelo murino de MC, apresentando sinais clínicos da doença e alterações histopatológicas do cérebro, como microhemorragias, edema cerebral e bloqueio do fluxo sanguíneo ocasionado pela aderência de leucócitos. Além disso, alterações de

outros órgãos como o pulmão, fígado, timo e baço também foram observadas, similarmemente as outras linhagens susceptíveis (Martins et al., 2009b).

Outro fator determinante para o desenvolvimento de fenótipos suscetíveis ou resistentes da MC é a intensidade da resposta imunológica, uma vez que as linhagens susceptíveis desencadeiam uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α . Esse mediador inflamatório é crucial para o desenvolvimento da MC, visto que a diminuição da expressão de receptores de TNF- α tipo 2 (TNFR2) ocasiona diminuição da susceptibilidade de camundongos a MC (Kremsner et al., 1991; Senaldi et al., 1999).

Neste contexto, a migração de leucócitos para a microvasculatura cerebral induz o aumento da resposta inflamatória, promovendo a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α . Este processo ocasiona o aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, aumentando também a citoaderência de células parasitadas na microvasculatura cerebral (Lou et al., 1998). Apesar de bem caracterizado que esta patologia compromete ativamente o tecido cerebral, pouco se sabe a respeito das alterações funcionais nas demais regiões do SNC, como o tecido retiniano.

1.5 Retinopatia associada a malária cerebral

Assim como outras regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) a retina é alvo de diversas doenças, como glaucoma, retinopatia diabética e desordens retinianas hereditárias (Lamba et al., 2008). Dentre os estudos relacionados à imunopatogênese da MC, uma vertente procura caracterizar as possíveis alterações do tecido retiniano, visto que pesquisas elucidaram o desenvolvimento de uma retinopatia associada a esta patologia (Lewallen et al., 2008).

Estudos sugerem que o desenvolvimento da retinopatia associada a MC, esteja relacionado ao seqüestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura retiniana, seguido de hipoxia aguda do tecido, ocasiona focos hemorrágicos (Beare et al., 2006; Maude et al., 2009). Além disso, outras manifestações clínicas podem ser observadas, como o embranquecimento retiniano, descoloração dos vasos sanguíneos e papiloedema (Figura 7) (Beare et al., 2006; Maude et al., 2009; Sayeed et al., 2011). Essas manifestações podem ocasionar alterações morfofuncionais de células glia como astrócitos e microglia (Medana et al., 1996; Medana et al. 1997a).

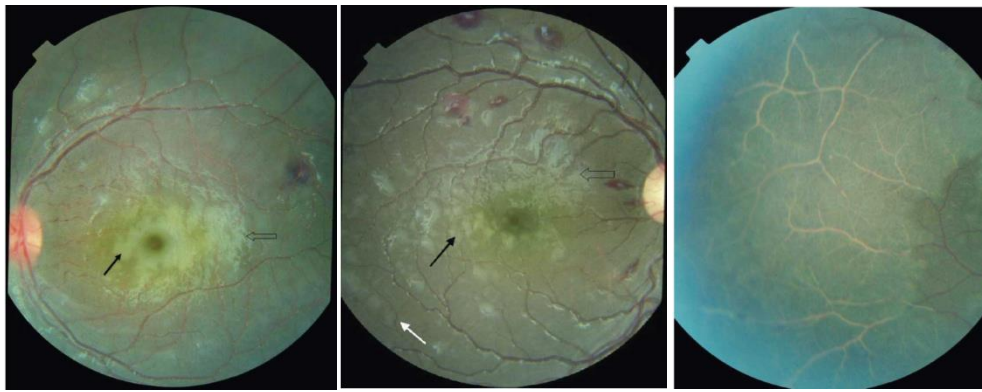


Figura 7: Manifestações clínicas observadas em pacientes com o quadro de malária cerebral. (A) Presença de papiloedema; (B) Embranquecimento retiniano; (C) Descoloração dos vasos sanguíneos. Fonte: Adaptado de Beare et al., 2006.

Em modelo murino de MC, uma perda na distribuição dos astrócitos é observada a partir do 3º dia após a inoculação com PbA, que progride para um quadro de astrogliose nos dias subsequentes, gerando intensa perda dos astrócitos em contato com o vaso sanguíneo no estágio final da doença (Medana et al., 1996). As alterações na morfologia e distribuição dos astrócitos próximos aos vasos sanguíneos estão claramente associadas à aderência de monócitos no endotélio vascular, sugerindo que metabólitos tóxicos produzidos por essas células podem exercer um papel fundamental na degeneração dos astrócitos (Medana et al., 2001).

Além disso, foi demonstrado que a perda de funcionalidade dos astrócitos pode resultar na alteração da atividade neuronal da retina, sendo que a produção de mediadores inflamatórios pelas células da microglia pode potencializar esse efeito (Medana et al., 1997b; Hunt et al., 2006). Enquanto a maioria dos estudos ressalta a participação dos astrócitos e da microglia no quadro de MC no tecido retiniano, poucos trabalhos demonstram o envolvimento da glia de Muller neste processo. Este tipo celular, juntamente com os astrócitos e microglias são de fundamental importância no tecido retiniano, por serem responsáveis por garantir a homeostasia deste tecido (Bringmann et al., 2009).

O tecido retiniano é localizado na região posterior do globo ocular, apresentando organização laminar e cinco tipos diferentes de neurônios: fotorreceptores, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares (DeVries S., 2000; Euler et al., 1996).

Os fotorreceptores são divididos em dois tipos, caracterizados de acordo com sua estrutura, composição e função. Os fotorreceptores do tipo bastonetes possuem alta sensibilidade ao estímulo luminoso, por apresentar maior quantidade de

fotopigmento (rodopsina), tornando-se responsáveis pela visão noturna. Já os fotorreceptores do tipo cones possuem menor sensibilidade à luz e menor quantidade de fotopigmento (Opsina), necessitando de uma maior intensidade de estímulo luminoso para realizar o processamento de informação (fototransdução), tornando-se responsáveis pela visão ao claro (Dowling. J, 1997, 1979; O'Brien. D, 1982).

O mecanismo de fototransdução consiste na conversão de energia luminosa em variação do potencial de membrana realizado por cones e bastonetes no tecido retiniano. Inicia-se a partir da presença de um estímulo luminoso, detectado pelo segmento externo dos fotorreceptores. Após a estimulação dos fotorreceptores, receptores de membrana associados à proteína G serão ativados, iniciando a produção de fosfatidilesterase. A fosfatidilesterase hidrolisará GMPc (do inglês: Cyclic Guanosine Monophosphate), reduzindo seus níveis intracelulares. A diminuição dos níveis de GMPc ocasiona a diminuição do fluxo de cátions pelos canais de N^+ presentes no segmento externo dos fotorreceptores, levando a hiperpolarização graduada da célula, ocasionando a diminuição da liberação do neurotransmissor glutamato (Kolb H., 2003).

Embora a retina possua um circuito elétrico bem caracterizado entre os diferentes neurônios responsáveis pela fototransdução, a comunicação química entre eles é modulada por diferentes sistemas de neurotransmissores. Dentre eles, pode-se destacar o sistema glutamatérgico, principal via excitatório do SNC de mamíferos, e o sistema gabaérgico, principal via inibitório (Quinlan et al., 1999; Shigeri et al., 2004; Yang, 2004).

No tecido retiniano existem duas vias pelas quais os diferentes neurônios processam a informação induzida pela luz. Na primeira delas, o glutamato é liberado por fotorreceptores estimulando células bipolares que, conseqüentemente, liberam

glutamato estimulando células ganglionares, estas, por sua vez, projetam axônios através do nervo óptico até o córtex visual. Esses mecanismos são modificados pela segunda via (via lateral), na qual as células horizontais e amácrinas modulam a excitação promovida pelo glutamato através da liberação de GABA (Barnstable, 1993; Sun & Crossland, 2000; Tachibana & Kaneko, 1988; Yazulla, 1986).

Neste contexto, possíveis alterações na funcionalidade destas células podem ocasionar o mau funcionamento da retina. Uma vez na fenda sináptica, tanto GABA quanto glutamato promovem a ativação de duas classes de receptores, os ionotrópicos e os metabotrópicos (compostos por receptores associados à proteína G). Essas classes de receptores encontram-se bem caracterizadas, apresentando ampla distribuição em todos os tipos de neurônios da retina (Yang, X., 2004).

Contudo, quando o glutamato encontra-se presente em elevada concentração no meio extracelular há intensa estimulação de receptores pós-sinápticos, levando a morte celular por excitotoxicidade, promovendo um intenso processo de degeneração, característico de inúmeras desordens neurológicas e processos isquêmicos (Hazell, A., 2009; Sheldon & Robinson, 2007; Suemori et al., 2006).

A homeostasia do sistema glutamatérgico é realizada por sistemas de transporte bem caracterizados no tecido retiniano. Estes sistemas de transporte podem ser localizados nos fotorreceptores, neurônios e glias. Contudo, os astrócitos e as células de Muller são os principais responsáveis pela remoção do glutamato da fenda sináptica (Rauen et al., 1996; Pow et al., 2000).

O transporte de glutamato é caracterizado pela dependência ou independência de íons, visto que em sistemas que possuem transporte dependente de Na^+ (sistema X_{AG^-}), o transporte de glutamato envolve o co-transporte de 3 íons Na^+ , 1 próton e o

contra-transporte de 1 íon K^+ . O sistema X_{AG^-} apresenta uma distribuição uniforme nas diferentes camadas da retina, sendo expressos tanto em células neuronais (ex. GLT-1; EAAT5) quanto nas células gliais (ex. GLAST); (Pow, 2001b; Rauen, 2000).

Por outro lado, em sistemas que possuem transporte independente de Na^+ (sistema X_{CG^-}), normalmente ocorre a captação de cistina e liberação de glutamato, porém quando o glutamato apresenta elevadas concentrações na fenda sináptica, o sistema de transporte é invertido e o glutamato passa a ser captado e a cistina liberada. O sistema X_{CG^-} por sua vez apresenta distribuição mais restrita, sendo encontrado predominantemente nos astrócitos e células de Muller (Oliveira et al., 2010; Pow, 2001b; Rauen, 2000).

O mau funcionamento dos sistemas de transporte, principalmente o presente em células de Muller, ocasionado por diversas doenças como glaucoma, diabetes, isquemia e degeneração de fotorreceptores pode desencadear o processo de excitotoxicidade promovido pelo aumento de glutamato na fenda sináptica (Delyfer et al., 2005).

Processos isquêmicos e doenças como a diabetes não alteram significativamente a expressão dos transportadores de glutamato, porém diminuem sua atividade. Já em modelos de glaucoma foi demonstrada uma diminuição na expressão destes transportadores assim como em sua atividade, desencadeando a degeneração do tecido retiniano (Holcombe et al., 2008). O aumento da pressão intraocular promove a hipóxia do tecido, desencadeada pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, assim como peroxidação lipídica, resultando na disfunção do transporte de glutamato em células de Muller (Holcombe et al., 2008). Essa alteração no transporte de glutamato pelas células de Muller pode estar correlacionada com o surgimento de

eventos hemorrágicos no tecido retiniano ocasionando alteração na funcionalidade da retina, visto que doenças associadas a degeneração da barreira hematorretiniana (BHR) promovem a diminuição do transporte de glutamato (Gass, 1997; Kusaka et al., 1999).

Contudo, poucos estudos buscaram elucidar os efeitos da patogênese da MC nos sistemas de neurotransmissão do SNC, tornando-se fundamental o desenvolvimento de estudos que busquem caracterizar esses efeitos. Recentemente, com o propósito de caracterizar um marcador neuroquímico para a MC, Miranda et al. (2010) investigaram o envolvimento do glutamato no desenvolvimento dos sintomas comportamentais associados a MC e observaram que os níveis extracelulares de glutamato aumentavam significativamente apenas no 6º dia após a infecção, quando os sintomas clínicos da MC se manifestavam. Enquanto que no 3º dia após a infecção (ausência de sintomas) os níveis extracelulares desse neurotransmissor permaneciam semelhantes ao grupo controle.

Além do glutamato, o GABA representa outro neurotransmissor fundamental para modulação da funcionalidade do tecido retiniano. Dentre os principais tipos celulares da retina, as células horizontais, amácrinas, bipolares e ganglionares são responsáveis pela sua liberação na fenda sináptica, sendo que a modulação de GABA na fenda sináptica é realizada por transportadores presentes em neurônios pré-sinápticos, bem como células gliais (Johnson et al., 1996; Pow et al., 1996).

A captação de GABA é mediada principalmente pelos transportadores de alta afinidade de GABA dependentes de Na^+ e Cl^- (GATS); visto que o transporte de GABA está associado ao co-transporte de 2 íons Na^+ e 1 íon Cl^- . Estudos demonstraram que a retirada de íons Na^+ e Cl^- do meio extracelular inibe o transporte de GABA. A

localização de GATS encontra-se bem descrito na literatura, presente principalmente em células amácrinas e células de Muller (Pow et al., 1996). Além disso, os mecanismos envolvidos na liberação de GABA vêm sendo muito estudados, sendo demonstrado que o glutamato induz liberação de GABA, através da ativação de receptores ionotrópicos de forma independente de Ca^{2+} (Kamada et al., 1981; Yazulla, S, 1986).

O papel dos sistemas glutamatérgico e gabaérgico na funcionalidade do tecido retiniano encontra-se bem descrito na literatura. Entretanto, poucos estudos buscam correlacionar possíveis alterações desses sistemas com o desenvolvimento de diversas doenças, como a malária cerebral. Diante disso, faz-se necessário caracterizar alterações neuroquímicas, bem como funcionais do tecido retiniano associados a patogênese da malária cerebral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta inflamatória bem como as alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas no tecido retiniano de camundongos albino suíço infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA).

2.2 Objetivos específicos

- Validar o quadro de MCE a partir da avaliação do surgimento dos sinais clínicos associados à doença, juntamente com a determinação da curva de sobrevivência, parasitemia e alterações no ganho de massa corpórea de camundongos albino suíço nos dias pós-infecção com a cepa PbA.

- Caracterizar a presença de extravasamento vascular no tecido cerebral de camundongos albino suíço inoculados com cepa PbA no 7º d.p.i.

- Avaliar a resposta inflamatória dos animais inoculados com a cepa PbA através da quantificação das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6 nos tecidos cerebrais e retinianos no 7º dia pós-infecção.

- Avaliar a liberação e captação dos neurotransmissores glutamato e GABA no tecido retiniano de camundongos inoculados com a cepa PbA no 7º dia pós-infecção.

- Determinar as possíveis alterações funcionais do tecido retiniano de camundongos com o quadro de MCE pelo uso do Eletrorretinograma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem albino suíço (machos e fêmeas), entre 46-54 dias pós-natal, pesando aproximadamente 20-25 gramas, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em grupos de no máximo 5 camundongos por gaiola, em condições assépticas, com comida e água (NUVITAL) *ad libitum* e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) controladas.

As normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente aplicadas durante o desenvolvimento deste trabalho, estando este projeto aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) parecer 191-14.

3.2 Cepa ANKA de *Plasmodium berghei* e Infecção do Grupo Experimental.

Para infecção do grupo experimental foi utilizado a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, obtida no Instituto Evandro Chagas (Ananideua-Pa). Alíquotas do sangue de camundongos inoculados com a cepa PbA foram criopreservadas em glicerol 30% podendo ser mantidas em nitrogênio líquido por tempo indeterminado.

Inicialmente, uma alíquota de sangue foi descongelada e inoculada em um camundongo albino suíço por injeção intraperitoneal (i.p). Ao atingir entre 5-10% de parasitemia, o sangue deste animal foi coletado por punção cardíaca.

Para obtenção do sangue por punção cardíaca o animal foi anestesiado com injeção i.p de solução de Cloridrato de Quetamina (1mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina

(1mg/Kg) e a amostra coletada com o uso de uma seringa de insulina contendo PBS/EDTA (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 0,8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; EDTA 10%; pH 7.4). Para garantir um grau de inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram inoculados intraperitonealmente com inóculo de 10⁶ eritrócitos parasitados em 100µl de PBS. A quantificação dos eritrócitos infectados foi realizada pela contagem em câmara de Neubauer do número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia. Os camundongos controle receberam apenas 100µl de PBS via i.p. Os grupos experimentais controle e infectado com a cepa PbA foram compostos por 7 e 13 camundongos, respectivamente.

3.3 Caracterização do Quadro de Malária Cerebral Experimental, Curva de Sobrevivência e Parasitemia

Para caracterizar o quadro de MCE foi observado o surgimento, entre o 6^o-10^o dia após a inoculação (d.p.i.), dos sinais clínicos neurológicos que incluem: ataxia, paralisia (monoplegia, hemiplegia, paraplegia ou tetraplegia), desvio de cabeça, desorientação, convulsão e coma. Juntamente a esta observação, foi realizada a curva de sobrevivência e parasitemia do grupo experimental inoculado com a cepa PbA. A curva de sobrevivência foi obtida a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito no seu respectivo dia pós-infecção (d.p.i).

A determinação da parasitemia dos animais foi realizada a partir da produção de distensões sanguíneas delgadas, em que uma gota de sangue foi obtida da veia da cauda de cada animal e distensões sanguíneas foram realizadas em lâminas histológicas. Após o período de secagem as lâminas foram fixadas em metanol

absoluto (P.A) por 2 minutos e, posteriormente coradas com Giemsa (10%) por 20 minutos.

A porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células (Figura 8). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000x maximização final). A contagem das células foi realizada com auxílio do programa ImageJ, o que garante maior precisão a porcentagem de parasitemia de cada animal.

$$\% \text{ de Parasitemia} = \frac{\text{Número de eritrócitos infectados}}{\text{Número total de células contadas (1000)}}$$

Figura 8: Desenho esquemático da equação utilizada para obtenção da porcentagem de parasitemia.

A determinação da parasitemia foi realizada nos dias 3, 5, 7 e 9 pós-infecção. Os animais que não apresentaram sinais clínicos do desenvolvimento do quadro de MCE foram mantidos até evoluírem a óbito e distensões sangüíneas foram realizadas a cada dois dias. Também foi realizado o registro da massa corpórea dos animais antes da inoculação da cepa de PbA e nos dias 3, 5, 7, 9 d.p.i, como um dos parâmetros clínicos do desenvolvimento da doença.

3.4 Permeabilidade Vascular

O ensaio de Permeabilidade Vascular foi realizado para caracterizar a presença de extravasamento vascular no tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa PbA e confirmar a presença do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE) pelo uso do corante Azul de Evans como marcador, adaptado do método descrito por Schmidt et al., (2011).

No 7º dia pós-infecção após cada experimento os camundongos dos grupos controle e infectados foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução de Cloridrato de Quetamina (1mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (1mg/Kg), seguido da injeção de 200µl do corante Azul de Evans (2%) no coração de cada animal. Após o bombeamento do corante para todo o corpo do animal, o mesmo foi perfundido com 10 ml de solução salina (0,9%) e o cérebro coletado por craniotomia, posteriormente o cérebro foi colocado em uma placa de petri, levado à uma lupa acoplada a sistema de captura de imagem (NIKON, modelo SMZ1500) para o registro da possível presença de extravasamento vascular na microvasculatura dos camundongos. Os animais infectados que não apresentaram presença de extravasamento vascular foram considerados com ausência de MCE, os quais foram avaliados separadamente como MCE-.

3.5 Quantificação de citocinas pelo método de ELISA

Para determinação do processo inflamatório dos animais com MCE os níveis de TNF- α , IL-10 e IL-6 foram quantificados por ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immuno Sobert Assay) com a utilização de kit específico para cada uma das citocinas. A

quantificação foi realizada no córtex e tecido retiniano dos grupos controle e infectado no 7º d.p.i.

Para obtenção dos tecidos de interesse os animais foram inicialmente anestesiados seguido pela dissecação dos seguintes tecidos utilizando CMF gelado (meio livre de cálcio e magnésio) (pH 7,4) para garantir a viabilidade das amostras. Primeiramente, foi realizado a dissecação do tecido retiniano e o mesmo foi transferido para tubos cônicos de 1,5 ml onde foi acrescido 500µl de tampão PHEN (MgCl₂ 9,8 mM; KCl 140 mM; EDTA 26 mM; HEPES 43,6 mM; PIPES 137,5 mM; Inibidor de protease 1%; pH: 6,9). Para obtenção do córtex foi realizado a craniotomia, posteriormente o tecido foi transferido para um tubo cônico de 5 ml e acrescido 1 ml de tampão PHEN. Em seguida, as amostras foram sonicadas em um homogeneizador de tecidos e centrifugadas à 6000 rpm a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado a -20°C até a realização da dosagem. Uma alíquota destas amostras foi separada para posterior dosagem de proteína.

Para o ensaio de dosagem do TNF- α , IL-10, IL-6, as placas foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo de captura (1:200) durante 18 horas a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada com uma solução de PBS (0,05% Tween-20) e incubada com a solução de bloqueio por mais uma hora, em agitação. Em seguida, após uma nova série de lavagens, as amostras foram adicionadas a reação por um período de duas horas em temperatura ambiente. Paralelamente, para o estabelecimento da curva-padrão, foram utilizadas diferentes diluições do padrão TNF- α , IL-10 e IL-6, a uma concentração inicial de 500pg/ml.

Após a incubação das amostras e da curva-padrão, uma solução do anticorpo de detecção foi adicionada por mais uma hora, seguida da solução de avidina ligada a

peroxidase (HRP). Após a adição do substrato TMB, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2N). A quantidade de TNF- α , IL-10 e IL-6 em cada poço foram determinadas, separadamente, com auxílio do leitor de microplaca em um comprimento de onda de 450nm, sendo que a concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva-padrão correspondente em pg/mg de proteína e expressa em porcentagem em relação ao controle.

3.6 Quantificação de glutamato e GABA

Para avaliação das possíveis alterações neuroquímicas no tecido retiniano de camundongos inoculados com a cepa PbA foi realizado o ensaio de liberação de glutamato (Glu) e GAMA-AMINO-N-BUTÍRICO (GABA) e o ensaio de captação de glutamato no 7º dia pós-infecção (d.p.i).

Inicialmente, foi realizado o ensaio de liberação de glutamato e GABA no 7º d.p.i. Os animais foram anestesiados, sacrificados por deslocamento cervical e o tecido retiniano dissecado em solução de Hank (NaCl 128 mM; KCl 4 mM; MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2mM, glicose 12mM e HEPES 20mM; pH 7,4) gelado. Posteriormente, o tecido foi submetido ao ensaio de liberação de glutamato e GABA durante 20 minutos em 500 μ l de solução de Hank a 37°C. Em seguida, o meio de incubação foi coletado e armazenado para posterior quantificação.

Para o ensaio de captação de glutamato, o tecido foi obtido como descrito anteriormente. Neste ensaio, o tecido retiniano foi lavado em solução de Hank (3x) e incubado com 500 μ l solução de Hank contendo 50 μ M de glutamato durante 10 minutos, em seguida a amostra foi coletada e congelada para posterior análise. O tecido retiniano foi homogeneizado em 500 μ l de PBS/NaOH 1N para posterior

dosagem de proteína. As amostras foram quantificadas pelo Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE) (Figura 9).

Para quantificação de glutamato e GABA foi utilizado o método descrito por Moraes et al., (2012). O sistema CLAE apresenta fase móvel com gradiente composto por fase A (Tampão acetado de sódio 50 μ M e metanol); (PH 5,67) e fase B (metanol 70 %), fluxo de 1,2 ml/min, corrida de 25 minutos, detector fluorescente, comprimento de onda de excitação 340nm e emissão de 460nm.

As amostras previamente coletadas e armazenadas foram descongeladas e adicionada 20 μ l de ácido tricloracético (TCA) a 1% para precipitação da proteína presente na amostra, a mesma foi centrifugada a 7000 rpm durante 5 minutos, 300 μ l do sobrenadante foi coletado e 20 μ l de homoserina (padrão interno) foi acrescido. Uma vez a amostra pronta, foi realizada a derivatização da amostra com o objetivo de aumentar a sensibilidade de detecção. Em um tubo cônico âmbar, foi adicionado 60 μ l de amostra, 40 μ l de tampão borato (pH 9.5) e 10 μ l de OPA (13 mg de Ortoftaldeído + 16,3 mg de N-acetil-cisteína diluído em 300 μ l de metanol). Após 5 minutos de reação, a amostra foi injetada no Sistema CLAE para ser detectada e quantificada.

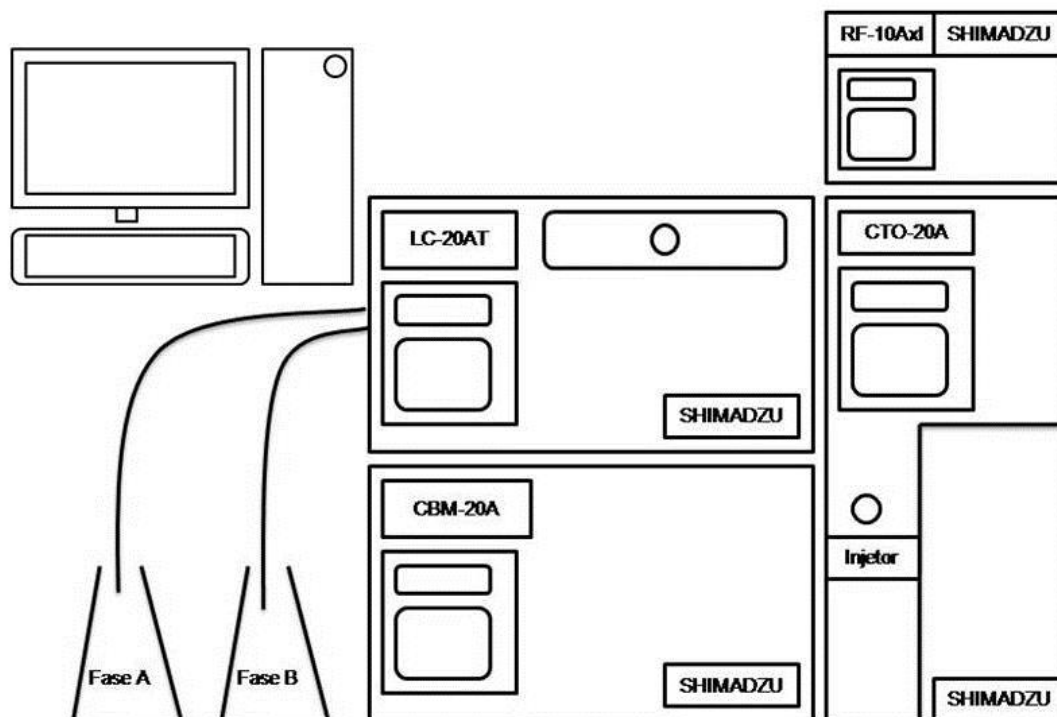


Figura 9: Desenho esquemático do Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficácia utilizado (CLAE) nos experimentos.

3.7 Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976). Este método foi realizado para normatização da quantificação de glutamato e GABA que foi liberado pelo tecido retiniano. As amostras previamente obtidas foram descongeladas e no tubo cônico com volume de 3 ml foi adicionado 50 μ l de amostra e 150 μ l de água destilada (H₂O_d), posteriormente foi adicionado 2 ml de reativo de Bradford (100 mg Azul Brilhante de Coomassie, 50ml de etanol 95%, 100ml de ácido fosfórico 85%) o qual reagiu com a amostra durante 2 minutos. De três em três tubos foram feitas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. Os valores foram obtidos de acordo com uma curva-padrão pré-estabelecida com BSA (Albumina Sérica Bovina).

3.8 Eletrorretinograma (ERG)

3.8.1 Equipamentos

Os pulsos de luz foram gerados por um fotoestimulador com tubo de xenônio, modelo PS33-PLUS, marca Grass Technologies. Foram utilizados filtros de densidade neutra, o qual reduz a intensidade luminosa para 1,5 unidades log e 0,5 unidades log. Foram utilizados eletrodos: eletrodo de aço tipo agulha, modelo F-E3-48; eletrodo de prata tipo disco de 6 mm, modelo F-E6SHC-12, ambos da marca Grass Technologies; eletrodo de filamento de prata (dobrado em forma circular em tamanho proporcional ao olho do animal) (Figura 10).

Os registros eletrofisiológicos que forem obtidos foram enviados a um amplificador diferencial AC com alta impedância de entrada (Grass Technologies, modelo P511), com filtragem passa-alta de 0,3 Hz e passa-baixa de 300 Hz. As respostas elétricas da retina foram amplificadas em 50.000 vezes, monitoradas com um osciloscópio (Protek, modelo 6510) com uma frequência de amostragem de 1 KHz por uma placa de aquisição de dados A/D (National Instruments, Austin, TX). Foi utilizado o programa Labview 3.0 (National Instruments, Austin, TX) para aquisição de dados.

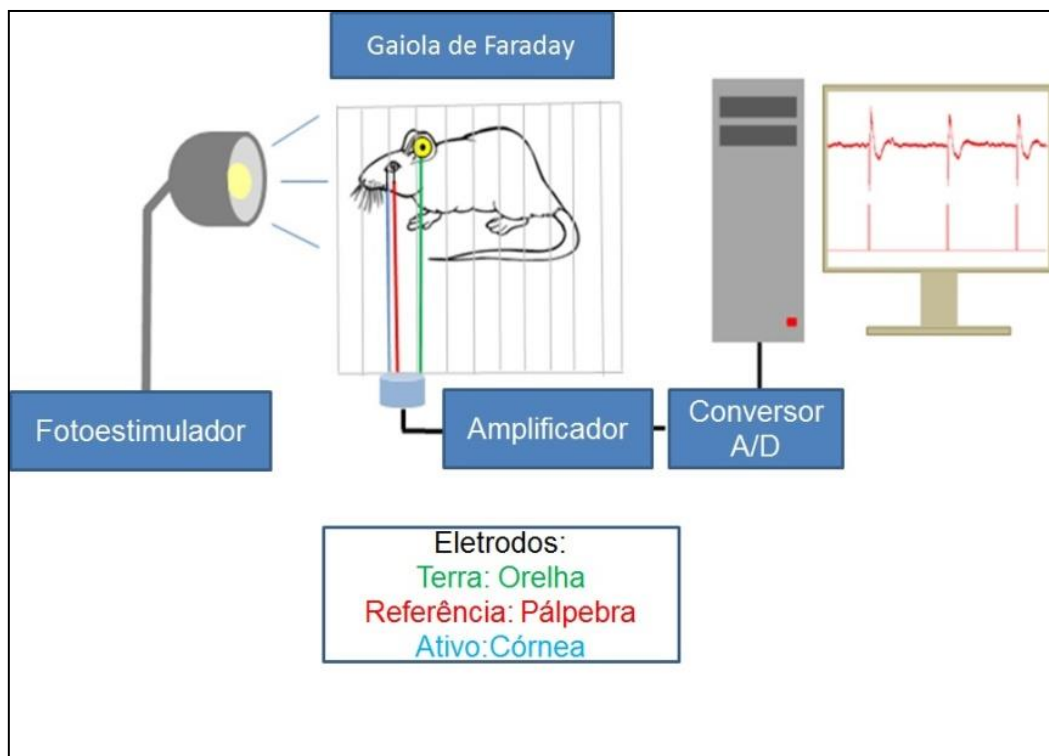


Figura 10: Desenho esquemático dos equipamentos de Eletroretinograma (ERG) utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho.

3.8.2 Procedimentos

Os registros foram realizados um dia antes da inoculação da cepa de PbA (i.p) ou injeção intraperitoneal de PBS e no 7º dia pós-infecção de acordo com protocolo adaptado de Harazny et al., (2009). Para os testes de resposta de bastonete e mista (bastonetes e cones) Os animais foram adaptados ao escuro por, no mínimo 14 horas (“overnight”) na sala de experimentação, com o objetivo de manter os bastonetes em seu limiar de ativação. Os registros eletrofisiológicos da retina foram realizados após anestésiar os animais com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de Quetamina (1mg/Kg) e cloridrato de Xilazina (1mg/Kg). Também foi previamente realizada a dilatação da pupila com uma gota de colírio tropicamida a 1%

(MydriacylAlcon®) para que o estímulo luminoso alcance maior área possível do tecido retiniano.

Após a dilatação da pupila, os eletrodos foram colocados com auxílio de uma lupa (3,5x) da seguinte forma: eletrodo ativo bipolar de filamento de prata posicionado sobre a córnea com colírio de metilcelulose a 2% para proteção da superfície da córnea; o eletrodo referência (tipo agulha) posicionado na pálpebra inferior (atravessando-a) e o eletrodo terra (tipo disco) na orelha ipsilateral ao olho que foi testado, utilizando uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O. WEAVER) aplicada no eletrodo, para facilitar a condução elétrica. Logo em seguida os animais foram posicionados na gaiola de Faraday (46,5x40,3x30cm), a 30cm do fotoestimulador.

Todos esses procedimentos foram realizados no escuro com auxílio de uma luz vermelha de baixa intensidade. Após os registros das respostas escotópicas, os camundongos foram adaptados ao claro por 3 minutos, para anular a participação de bastonetes, obtendo respostas isoladas de cones. Os estímulos luminosos foram obtidos por fotoestimulador modelo PS33-PLUS posicionado a 30 cm do olho do animal.

Foram apresentados estímulos de luz branca com diferentes intensidades, duração e intervalo interestímulos de acordo com o tipo de resposta que se pretende obter, baseado nos padrões estabelecidos. Para cada tipo de resposta foram emitidos 6 a 12 pulsos. A resposta final foi a média das respostas a cada pulso.

Os registros foram obtidos da seguinte forma:

a) Resposta de bastonete:

- Condição de adaptação: escotópica.
- Intensidade do estímulo: $< 0,09 \text{ cd.s/m}^2$.

- Duração do estímulo: 10 ms.
- Intervalo interestímulo: 2 segundos.
- Resposta: bastonetes.

b) Resposta mista 1 (Combinada bastonete-cone):

- Condição de adaptação: escotópica.
- Intensidade do estímulo: $0,378 \text{ cd.s/m}^2$, com uso de filtro de densidade neutra (redução de 1,5 unidades log).
- Duração do estímulo: 10 ms.
- Intervalo interestímulo: 10 segundos.
- Resposta: cones e bastonetes.

c) Resposta mista 3 (resposta escotópica máxima ou combinada bastonete-cone):

- Condição de adaptação: escotópica.
- Intensidade do estímulo: $10,215 \text{ cd.s/m}^2$.
- Duração do estímulo: 10 ms.
- Intervalo interestímulo: 10 segundos.
- Resposta: cones e bastonetes.

d) Resposta de cones ao flash único de luz branca:

- Condição de adaptação: fotópica (3 minutos).
- Intensidade do estímulo: $10,215 \text{ cd.s/m}^2$.
- Duração do estímulo: 10 ms.
- Intervalo interestímulo: 1 segundo.
- Resposta: cones.

3.8.3 Mensuração dos componentes ffERG

As respostas foram obtidas a partir de cada pulso de luz que foram promediadas e medidas com auxílio do programa Signal 3.0 como descrito a seguir: A amplitude da onda-*a* é a medida entre a linha de base e o pico máximo da onda-*a* e a amplitude da onda-*b* é a medida entre o pico máximo da onda-*a* e o pico máximo da onda-*b*. O tempo implícito de cada onda é medido entre o início do estímulo (flash) e o pico máximo da onda (Figura 11).

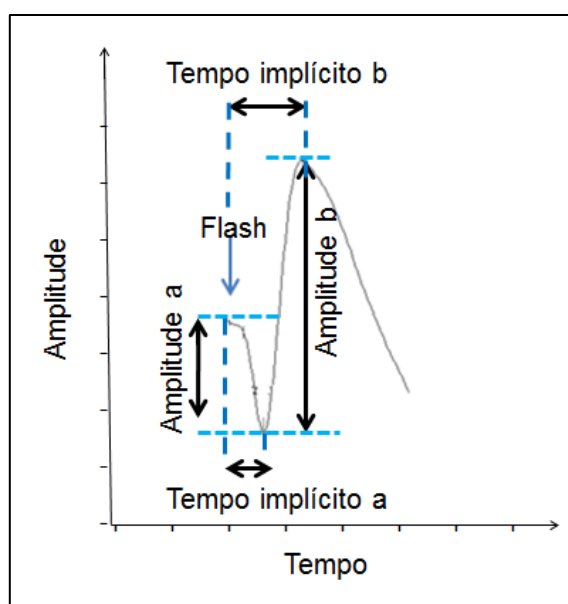


Figura 11: Desenho esquemático do registro obtido pelo Eletrorretinograma (ERG) e exemplificação dos parâmetros avaliados em cada registro.

3.9 Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste *Tukey-Kramer* (Controle; MCE-; MCE). Para análise de dois grupos (Controle e MCE) foi utilizado test *t* student. Todos as análises foram realizadas com o auxílio do programa BioEstat 5.3, considerando

como significativo $p < 0.05$. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do Quadro de Malária Cerebral Experimental

4.1.1 Curva de Sobrevivência e Sintomas Clínicos

Antes de caracterizarmos a resposta inflamatória, bem como as possíveis alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, uma série de parâmetros foram avaliados com o intuito de padronizar o desenvolvimento do quadro de Malária Cerebral Experimental (MCE) no grupo inoculado com a cepa PbA.

Inicialmente, foi avaliado o curso temporal da doença obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção. Durante este período, foi possível observar que a inoculação dos camundongos albinos suíço com a cepa PbA resultou em uma infecção aguda e letal que iniciou-se no 6º d.p.i., mantendo-se até o 10º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência no 6º d.p.i., (Figura 12).

Os camundongos inoculados com a cepa PbA que não apresentaram o quadro clínico da doença, caracterizados com ausência de Malária Cerebral Experimental (MCE-), evoluíram para óbito entre o 14º-26º d.p.i. (Figura 12), possivelmente pelo desenvolvimento de uma elevada parasitemia

Durante a evolução da doença também foram observados os primeiros sintomas clínicos e comportamentais apresentados pelos animais MCE, como: ataxia, hemiplegia, desvio de cabeça, desorientação, disfunção respiratória e picos convulsivos seguidos do estado de coma que iniciaram no 5º d.p.i., intensificando-se entre o no 6º d.p.i. e 8º d.p.i., momento em que a taxa de mortalidade desses animais aumenta significativamente.

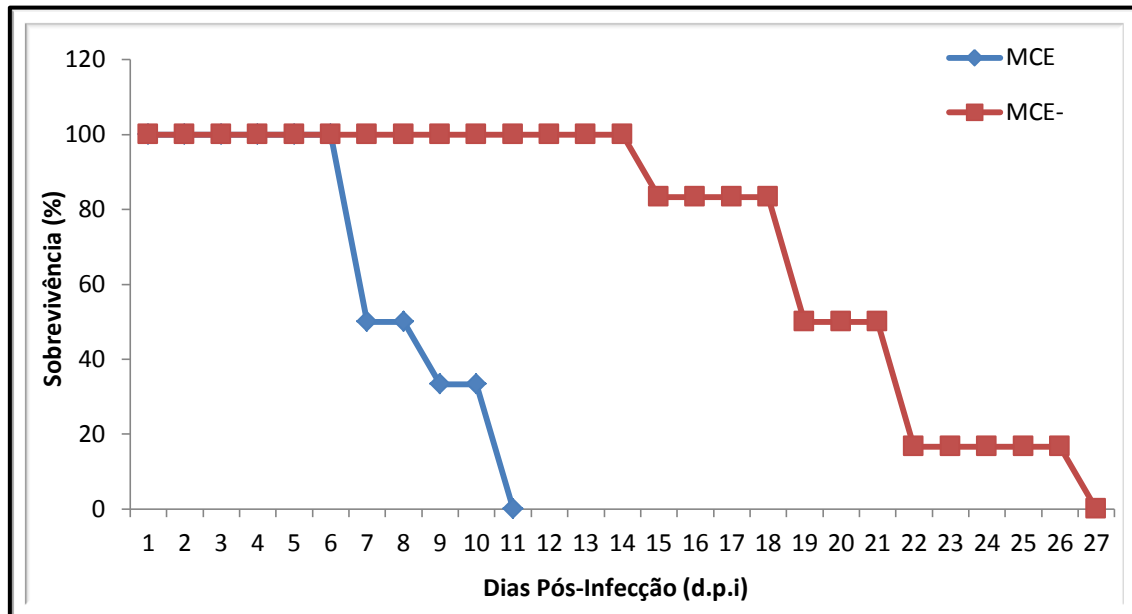


Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos albinos suíços infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais).

4.1.2 Parasitemia e Avaliação da massa corpórea

A evolução da parasitemia também foi acompanhada a partir da obtenção de distensões sanguíneas delgadas nos dias 3, 5, 7 e 9 pós-infecção. Durante esta análise, observou-se no 3º d.p.i a presença % de parasitemiados diferentes estágios do parasita na fase eritrocítica, como a forma de anel e trofozoíto jovem e maduro (Figura 13B). Somado a isso, no 7º d.p.i., os animais do grupo infectado apresentaram anormalidades morfológicas na membrana celular dos eritrócitos parasitados (Figura 13C), além de uma evidente e intensa evolução na parasitemia.

A análise do desenvolvimento da parasitemia no decorrer dos dias pós-infecção demonstrou uma rápida progressão da nos animais que desenvolveram o quadro de MCE. No 3º d.p.i, foi observada uma parasitemia inicial de ~4% que aumenta gradativamente a partir do 5º d.p.i (Figura 14). No 7º d.p.i, o nível de parasitemia dos animais que desenvolveram o quadro clínico da MCE foram maiores (~14%) quando comparado ao nível de parasitemia dos animais que apresentaram ausência do quadro clínico de MCE (MCE-) (~7%) (Figura 14). O acompanhamento da parasitemia demonstrou que os camundongos albino suíço que desenvolveram o quadro de MCE apresentaram uma baixa parasitemia no momento do óbito, em torno de 15-20% (Figura 14).

Além disso, também foi avaliada uma possível alteração no ganho de massa corpórea dos animais controle e infectados no decorrer dos dias pós-infecção. A massa corpórea dos animais foi mensurada nos dias 3, 5, 7 e 9 pós-infecção, permitindo observar que a infecção com a cepa PbA não ocasionou alteração no ganho de massa corpórea dos camundongos albino suíço infectados durante o estabelecimento da doença (Figura 15).

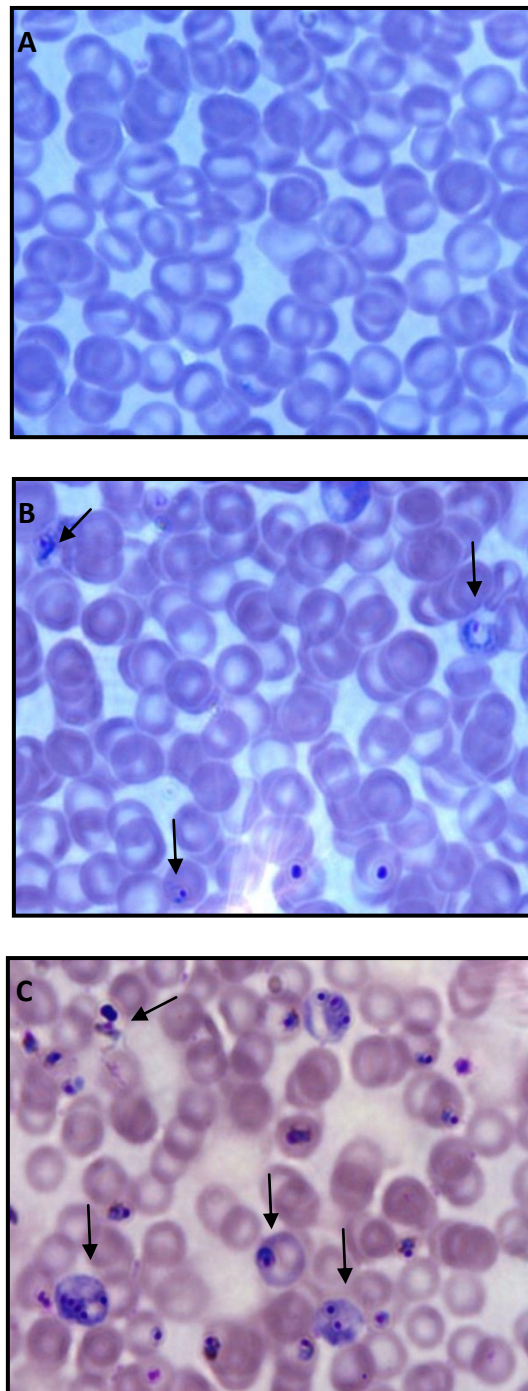


Figura 13: Fotomicrografias de distensões sanguíneas coradas com Giemsa (1000x). **A:** Controle; **B:** MCE no 3º d.p.i. As setas marcam a presença dos diferentes estágios eritrocíticos do protozoário; **C:** MCE no 7º d.p.i. As setas marcam o aumento da parasitemia, bem como, alterações estruturais e morfológicas das células sanguíneas comumente infectadas pelo parasita.

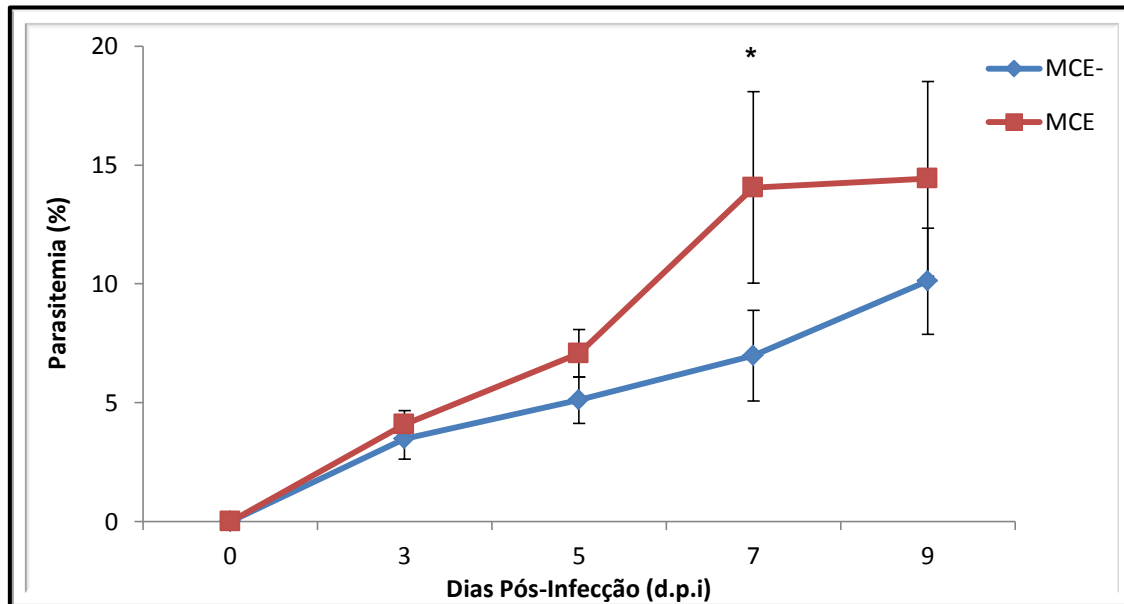


Figura 14: Evolução da parasitemia de camundongos albinos suíços infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais). * MCE vs MCE-; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$.

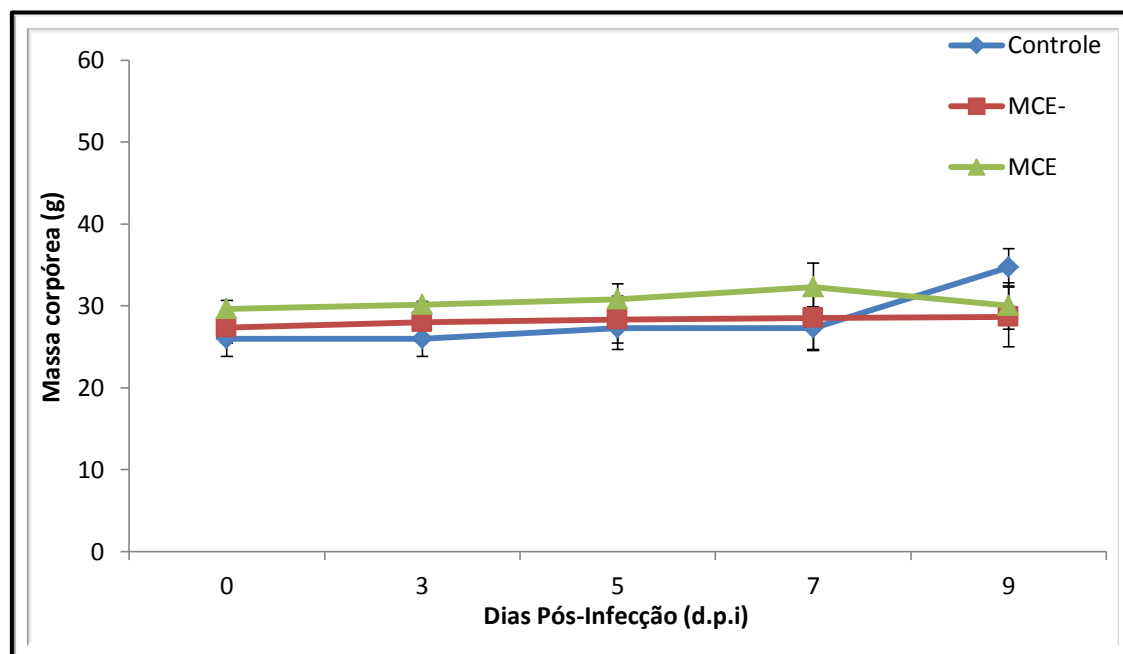


Figura 15: Avaliação do ganho de massa corpórea de camundongos albinos suíços controle e infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados ou PBS, apresentando três grupos experimentais: Controle (PBS); MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n= 13 animais).

4.1.3 Permeabilidade vascular pelo uso do corante Azul de Evans

O ensaio de permeabilidade vascular juntamente com os dados mostrados acima nos permitiu dividir o grupo infectado com a cepa PbA em animais que desenvolveram o quadro de MCE e animais que não desenvolveram o quadro (MCE-), a partir da presença ou ausência de extravasamento vascular do corante Azul de Evans.

Os animais controle e infectados foram submetidos ao Ensaio de Permeabilidade Vascular no 7º d.p.i, o qual nos permitiu observar que entre 13 animais infectados com a cepa PbA, 10 apresentaram os sinais clínicos da doença, juntamente com presença do extravasamento vascular do corante Azul de Evans (Figura 17C). A partir deste dado, pode-se observar uma taxa de incidência do quadro de MCE em torno de 77% (Figura 16), uma vez que, aproximadamente, 23% do grupo não desenvolveu o quadro de extravasamento vascular (Figura 17B), apresentando-se morfológicamente semelhante ao grupo controle (Figura 17A).

Ademais, também foi possível demonstrar a presença de várias microhemorragias no tecido cerebral dos camundongos que desenvolveram o quadro de MCE (Figura 18B) quando comparados ao grupo controle, que apresentou ausência de microhemorragias (Figura 18A).

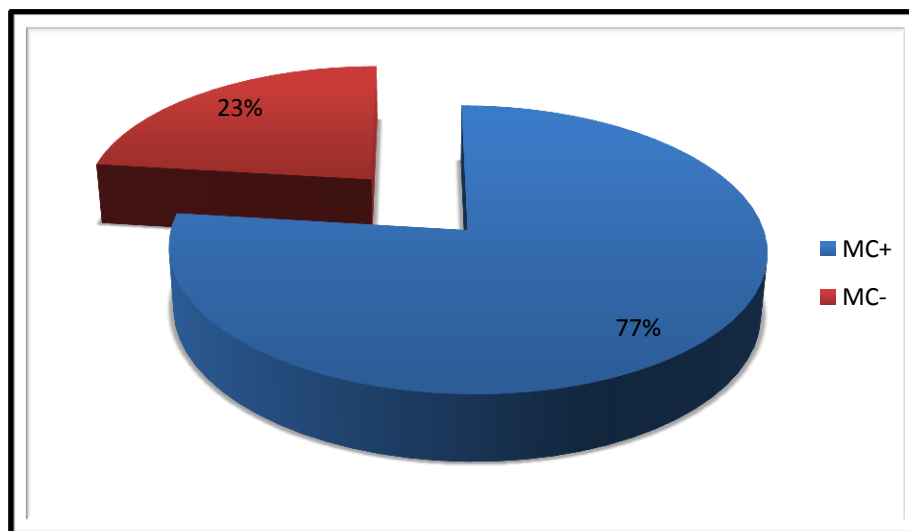


Figura 16: Incidência do quadro de MCE no grupo de camundongos albinos suíços controle e infectados com a cepa PbA. Os animais foram inoculados com 10^6 de eritrócitos parasitados, apresentando dois grupos experimentais: Controle; MCE- (Ausência de Malária Cerebral Experimental) e MCE (Presença de Malária Cerebral Experimental) (n = 13 animais).

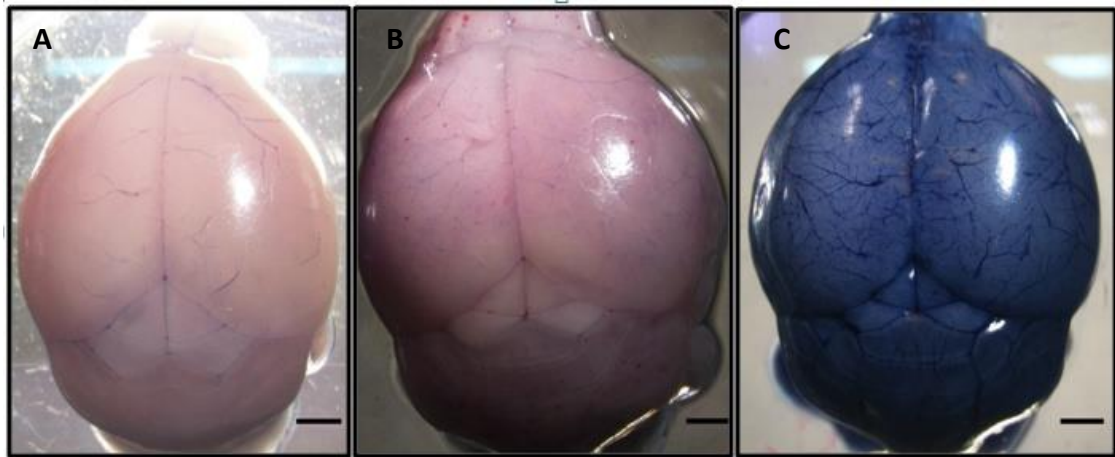


Figura 17: Ensaio de Permeabilidade Vascular pelo uso do corante Azul de Evans. **A:** Ausência de extravasamento vascular no cérebro de camundongos controle (PBS); **B:** Ausência de extravasamento vascular no cérebro de camundongos infectados que não desenvolveram o quadro de MCE (MCE-); **C:** Presença de extravasamento vascular no cérebro de camundongos infectados com a cepa PbA.

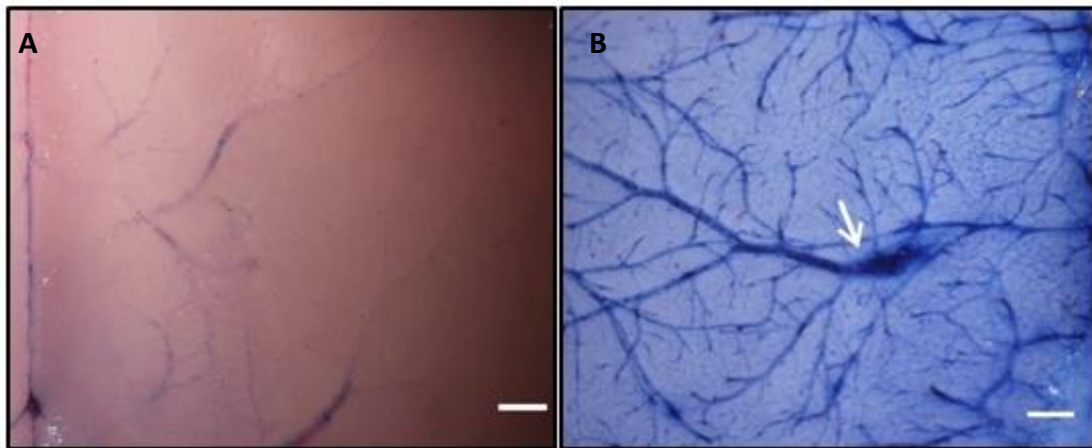


Figura 18: Ensaio de Permeabilidade Vascular pelo uso do corante Azul de Evans. **A:** Ausência de microhemorragias no cérebro de camundongos controle (PBS); **B:** Microhemorragias em cérebros de camundongos albino suíço infectados com a cepa PbA. A seta marca a presença de focos hemorrágicos caracterizando o extravasamento vascular no grupo MCE.

4.2 Níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10 no Córtex e na Retina de camundongos albino suíço infectado com cepa PbA

Para caracterizar a evolução da resposta inflamatória associada ao quadro da MCE realizou-se a dosagem de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e antiinflamatórias como IL-10 nos tecidos cerebrais e retinianos de camundongos albino suíço controles e infectados com a cepa PbA.

No tecido cerebral, observou-se que no 7º d.p.i a concentração de TNF- α aumentou significativamente nos animais infectados ($0,44 \pm 0,09$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,17 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 19). O mesmo pode ser observado para a IL-6, cuja concentração aumentou significativamente nos animais infectados ($0,35 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,08 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 20). Além disso, também demonstramos que a concentração de IL-10 também aumentou significativamente nos animais infectados ($1,82 \pm 0,55$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,19 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 21) no 7º d.p.i.

A partir dos dados acima, caracterizou-se um intenso processo inflamatório no tecido cerebral durante o desenvolvimento da infecção com a cepa PbA, o que garante a evolução do quadro clínico da doença com o comprometimento cerebral.

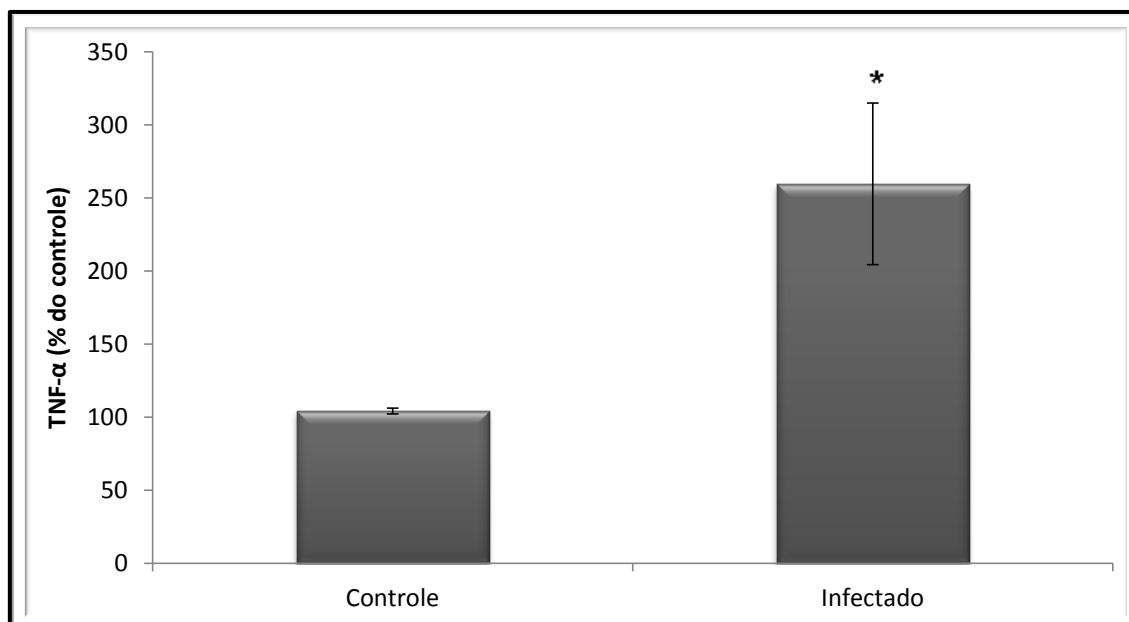


Figura 20: Concentração de TNF- α no cérebro de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).

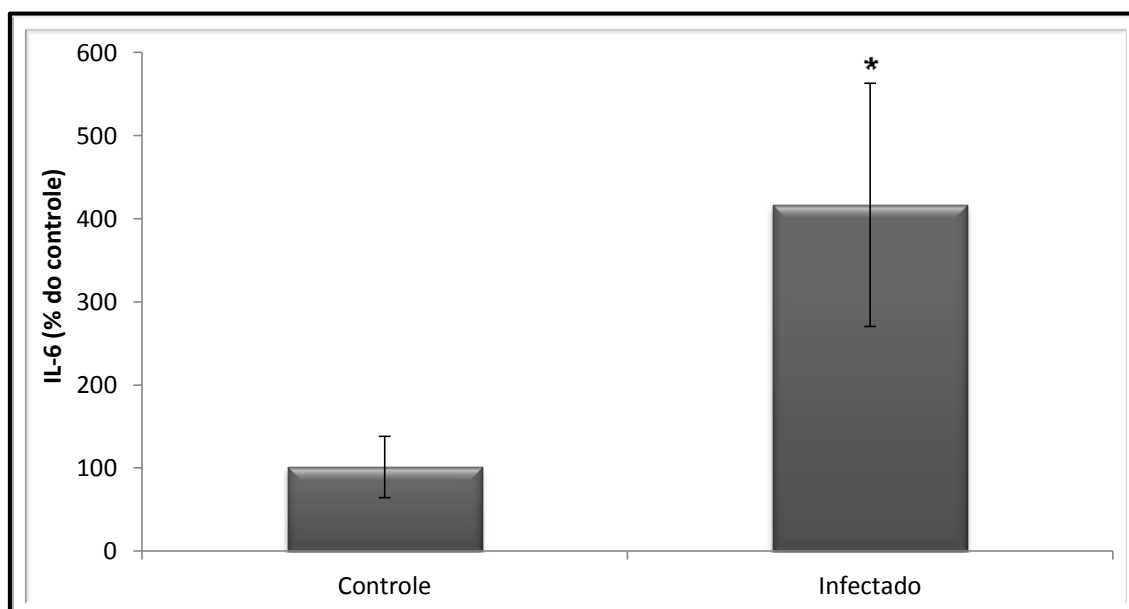


Figura 21: Concentração de IL-6 no cérebro de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).

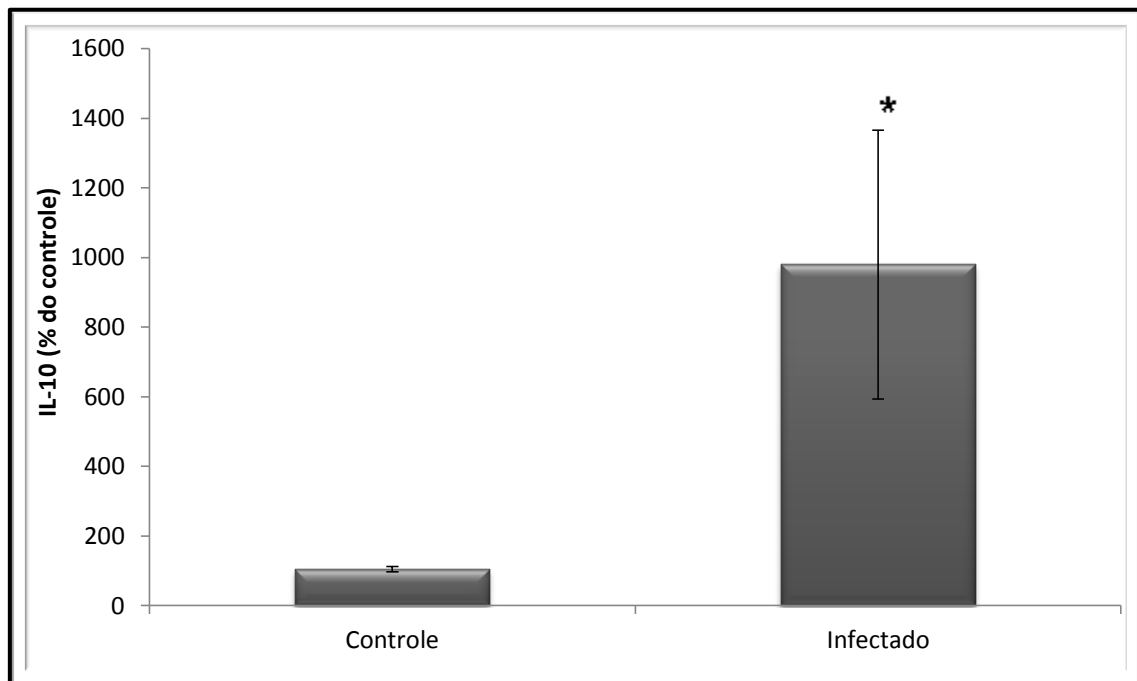


Figura 22: Concentração de IL-10 no cérebro de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (Test *t* Student).

Entretanto, as quantificações desses mesmos mediadores inflamatórios no tecido retiniano de camundongos albino suíço controle e infectados com a cepa PbA no 7^o d.p.i mostrou um perfil diferente.

No tecido retiniano, observou-se que não houve alterações nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α (Figura 23) e IL-6 (Figura 24). Além disso, demonstrou-se um significativo aumento na concentração de IL-10 nos animais que desenvolveram o quadro de MCE ($137,7 \pm 58,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($23,6 \pm 5,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e do grupo que não desenvolveu o quadro de MCE (MCE-) ($38,1 \pm 8,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 25). Sugerindo que o aumento nos níveis do mediador antiinflamatório IL-10 pode estar desempenhando um importante papel protetor na retina frente ao processo inflamatório comumente desencadeado no córtex durante o desenvolvimento do quadro da MCE.

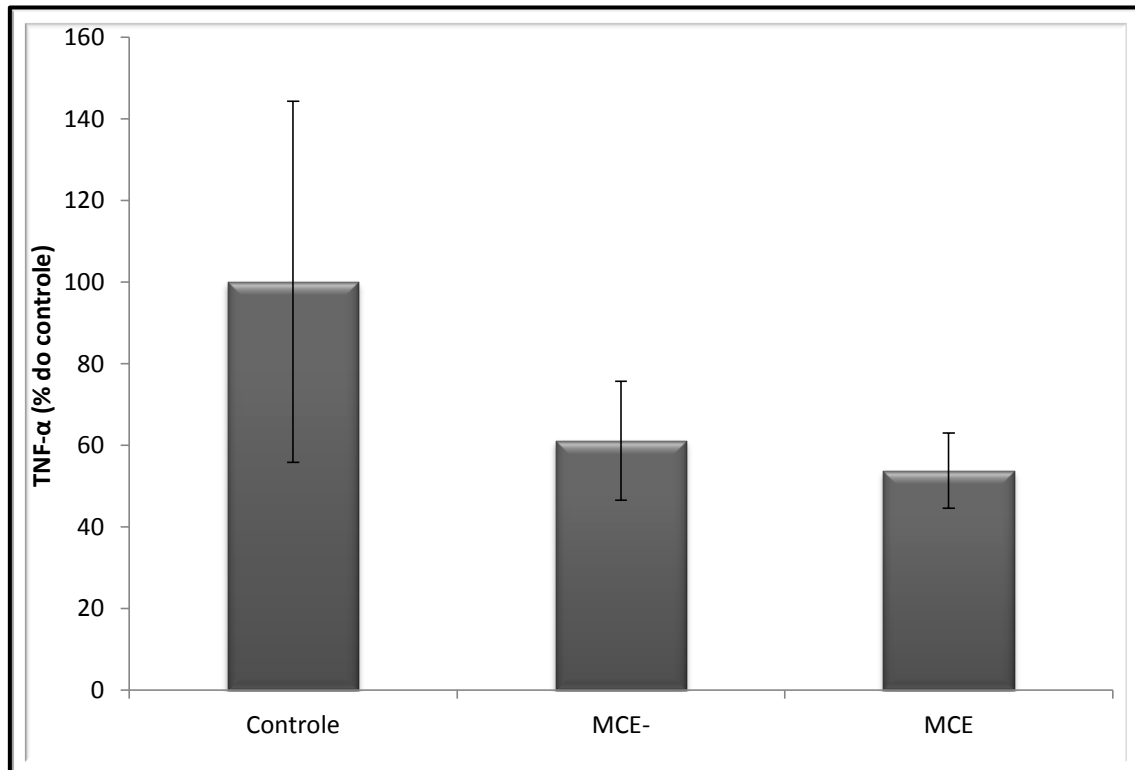


Figura 23: Concentração de TNF- α na retina de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão.

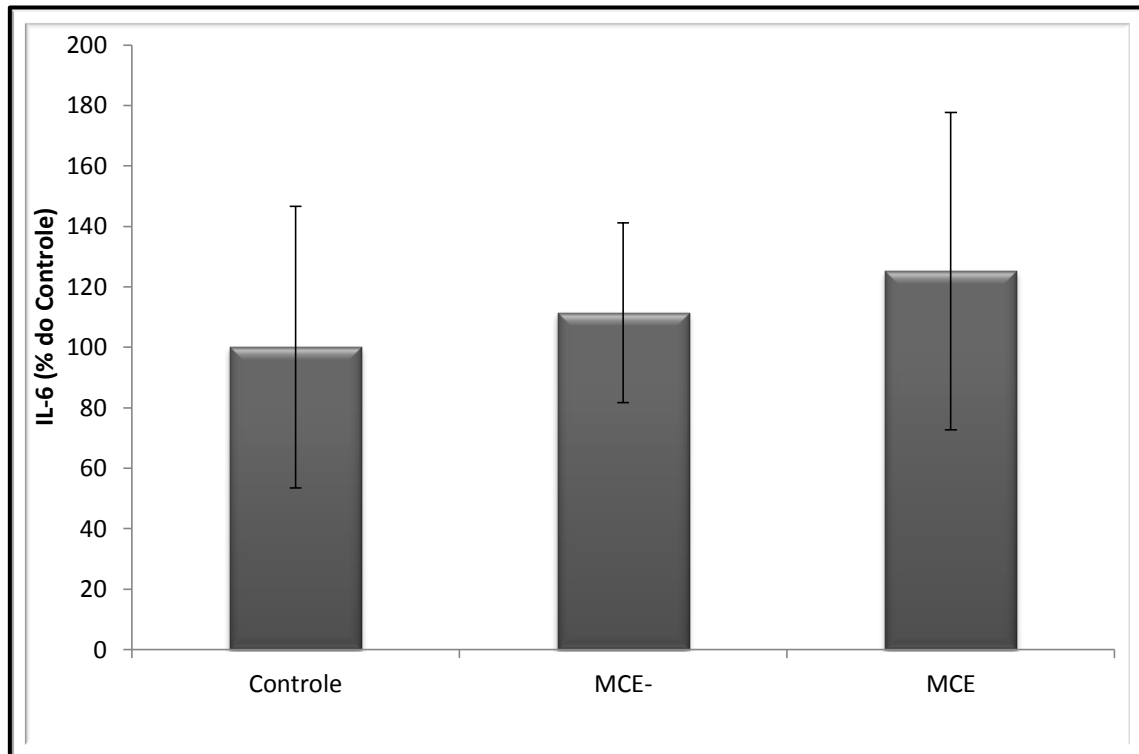


Figura 24: Concentração de IL-6 na retina de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão.

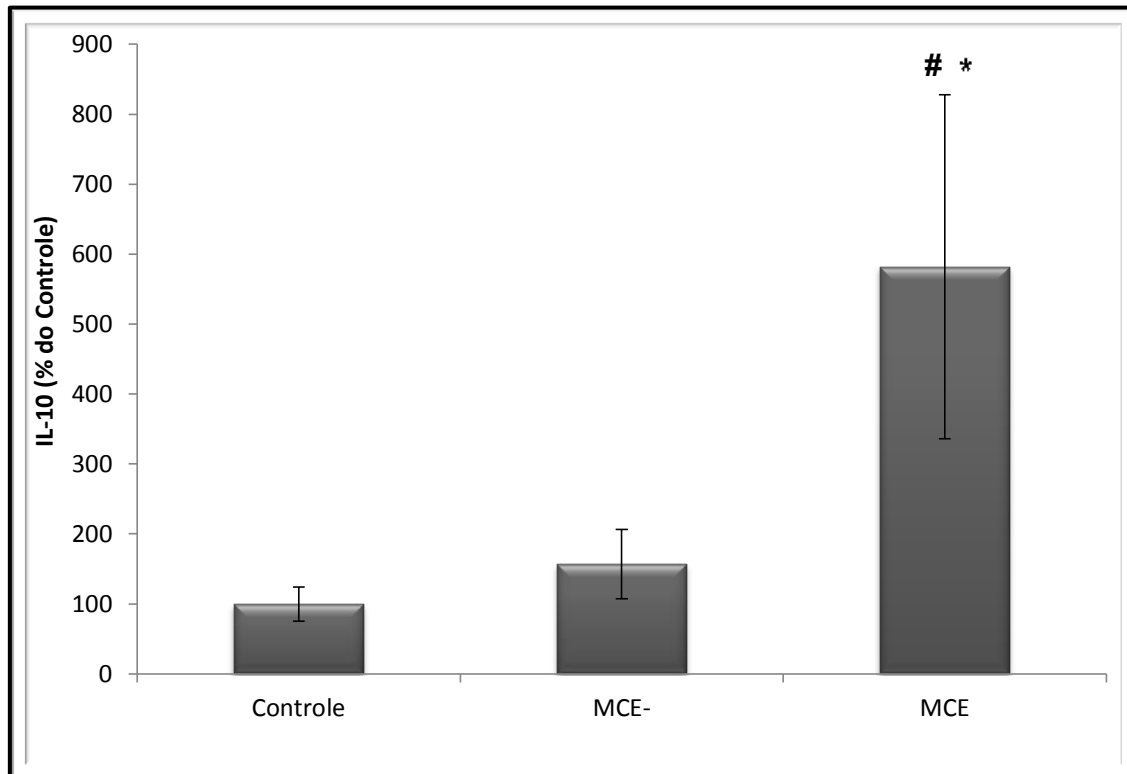


Figura 25: Concentração de IL-10 na retina de camundongos albino suíços no 7º dia pós-infecção com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).

4.3 Efeito da Malária Cerebral Experimental sobre a liberação de glutamato e GABA e captação de glutamato

Uma vez caracterizado o quadro de MCE em camundongos albinos suíços, bem como a evolução da resposta inflamatória, foi possível avaliar as possíveis alterações induzidas nos principais sistemas de neurotransmissão do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA.

Inicialmente, o tecido retiniano de camundongos controle e infectados foi submetido ao ensaio de liberação de glutamato e GABA no 7º d.p.i. Com relação aos níveis de glutamato, foi observado que o mesmo aumentou significativamente nos animais que apresentaram o quadro de MCE ($0,024 \pm 0,006 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,007 \pm 0,002 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) e aos animais que não desenvolveram o quadro de MCE (MCE-) ($0,01 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 26). Entretanto, com relação aos níveis de GABA, não foi observado diferença estatística entre os grupos (Figura 27), demonstrando que o quadro de MC experimental promoveu alteração apenas no sistema glutamatérgico.

Além disso, o tecido retiniano de camundongos controle e infectados também foi submetido ao ensaio de captação de glutamato no 7º d.p.i. Neste ensaio, observou-se que a concentração de glutamato captado aumentou significativamente nos animais que desenvolveram o quadro de MCE ($0,13 \pm 0,019 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,093 \pm 0,007 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 28). Observou-se, ainda, o aumento significativo da concentração de glutamato captado nos animais que não desenvolveram o quadro de MCE (MCE-) ($0,11 \pm 0,007 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) quando comparado aos animais do grupo controle ($0,093 \pm 0,007 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 28).

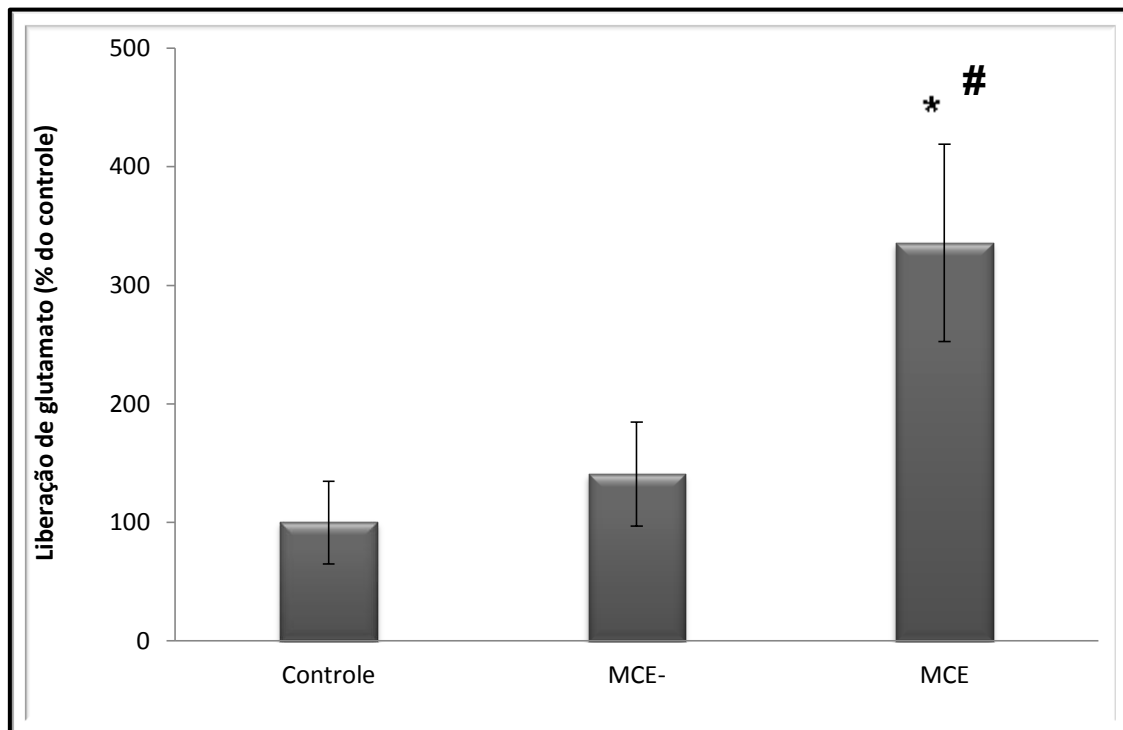


Figura 26: Liberação de glutamato no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).

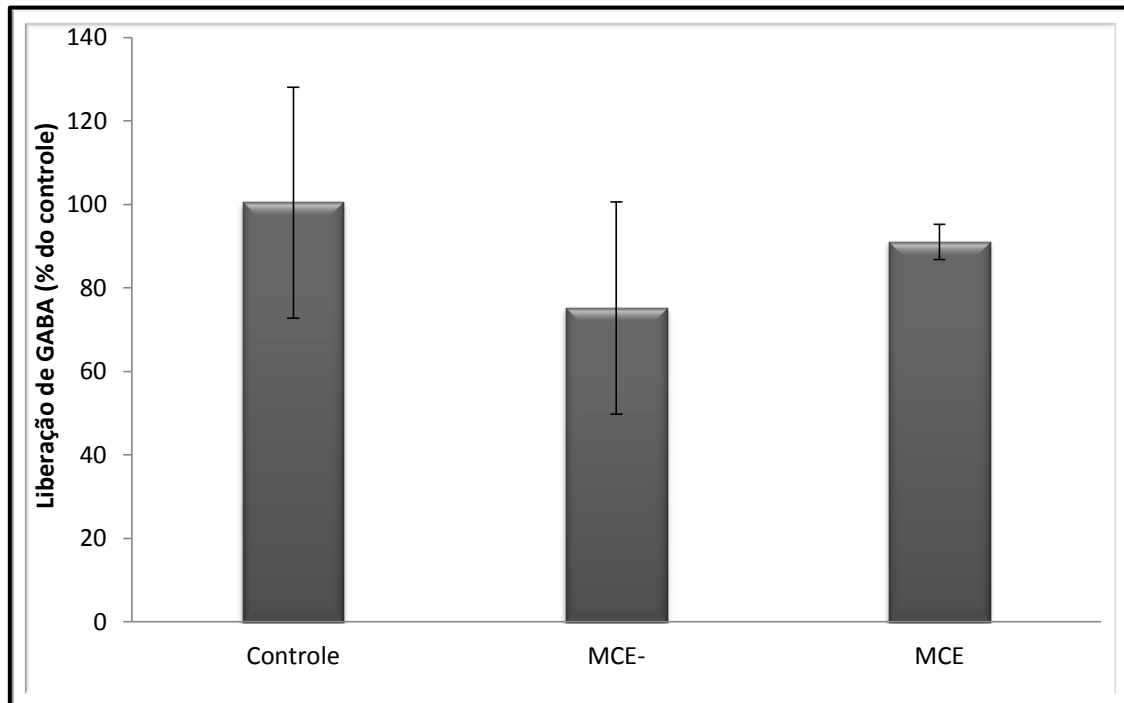


Figura 27: Liberação de GABA no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão.

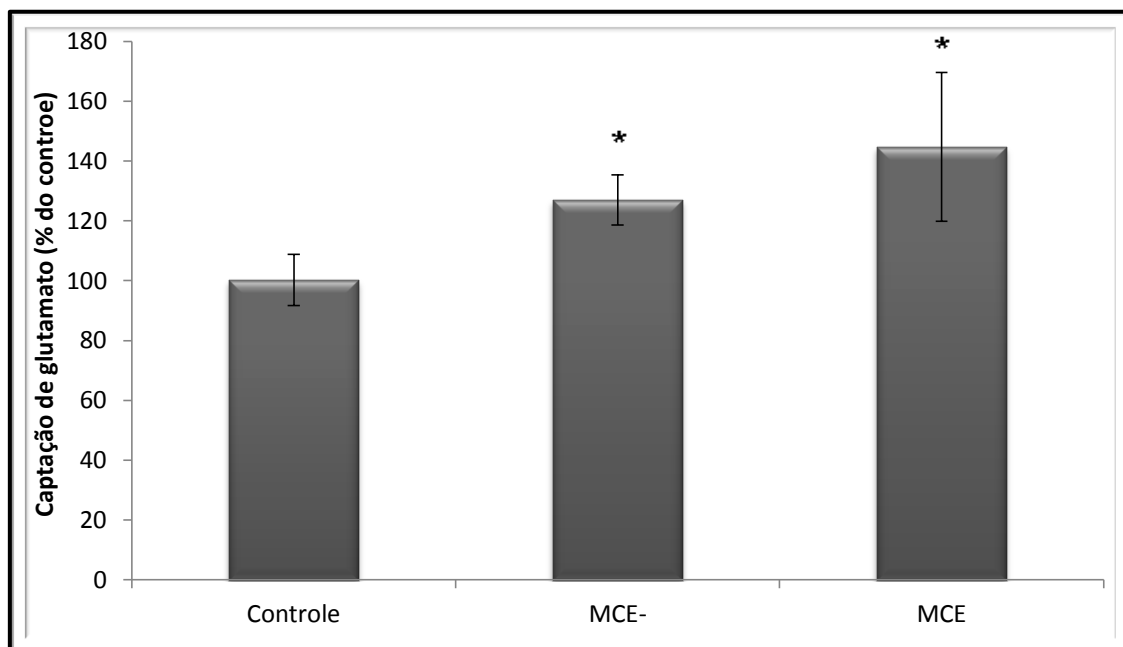


Figura 28: Captação de glutamato no tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. MCE representa os animais que desenvolveram o quadro de MC experimental; MCE- representa os animais que não desenvolveram o quadro de MC experimental. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE ou MCE- vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).

4.4 Avaliação das Respostas Eletroretinográficas no quadro de Malária Cerebral Experimental

A funcionalidade do tecido retiniano é modulada por dois principais sistemas de neurotransmissão, sendo eles o sistema glutamatérgico, principal via excitatória de neurotransmissão em mamíferos, e o sistema gabaérgico, principal via inibitória. Após observarmos os efeitos do desenvolvimento do quadro da MCE na neuroquímica da retina, tornou-se interessante elucidar quais seriam os efeitos ocasionados na funcionalidade propriamente dita do tecido retiniano em camundongos infectados com a cepa PbA.

Para elucidarmos tais efeitos, foi utilizado o Eletroretinograma de Campo Total, o qual nos permitiu avaliar o registro elétrico da retina em resposta a um estímulo luminoso pela estimulação simultânea em todo o campo visual permitindo uma avaliação em massa das células de toda retina. Nesse teste, os animais controle e infectados foram testados antes da infecção com o PbA e no 7º d.p.i., onde obtivemos respostas isoladas de bastonetes, mistas 1 e mista 3 (cones e bastonetes), e isoladas de cones, as quais foram divididas em amplitude de *onda-a* (resposta de fotorreceptores) e amplitude de *onda-b* (resposta de neurônios de segunda ordem). Além disso, também foi possível avaliar o tempo implícito (tempo de resposta da célula ao estímulo) de cada resposta obtida.

Com relação a amplitude de cada resposta obtida, observou-se que a amplitude de *onda-b* em respostas do tipo mista 1 (cone e bastonete) diminuiu significativamente nos animais infectados com a cepa PbA ($50,9 \pm 15,1 \mu\text{V}$) quando comparado aos animais controle ($100,9 \pm 19,5 \mu\text{V}$) (Figura 29B). Contudo, com relação as outras respostas como

isolada de bastonetes, mista 3 e isoladas de cones não foi observado diferença significativa entre os grupos (Figura 29).

Ao avaliarmos o tempo implícito de cada resposta obtida, observou-se que o mesmo aumentou significativamente para respostas isoladas de bastonetes nos animais infectados no 7^o d.p.i ($73 \pm 2,8$ ms) quando comparado aos animais do grupo controle ($65 \pm 1,4$ ms) e quando comparado entre o mesmo grupo no linha de base (antes da infecção) ($61,9 \pm 2,98$ ms) (Figura 30). Observou-se também aumento de tempo implícito para respostas de *onda-a* em resposta mista 1 nos animais infectados ($24,3 \pm 0,57$ ms) quando comparado aos animais do grupo controle ($17,5 \pm 0,7$ ms) e quando comparado entre o mesmo grupo no linha de base (antes da infecção) ($19,4 \pm 1,34$ ms) (Figura 31A), e aumento de tempo implícito para respostas de *onda-b* em resposta mista 3 nos animais infectados ($42 \pm 1,7$ ms) quando comparado aos animais do grupo controle ($32,3 \pm 3,2$ ms) e quando comparado entre o mesmo grupo no linha de base (antes da infecção) ($32,2 \pm 4,6$ ms) (Figura 31D). Além disso, demonstrou-se um aumento no tempo implícito no potencial oscilatório dos animais infectados ($26,5 \pm 0,5$ ms) quando comparado aos animais do grupo controle ($22 \pm 1,4$ ms) e quando comparado entre o mesmo grupo no linha de base (antes da infecção) ($22 \pm 1,2$ ms) (Figura 33). Ao avaliarmos o tempo implícito de respostas isoladas de cones não foi observado diferença significativa entre os grupos (Figura 32), bem como em respostas *onda-b* de mista 1 (Figura 31B) e *onda-a* de mista 3 (Figura 31C).

Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que o desenvolvimento do quadro de MC experimental é capaz de alterar a funcionalidade do tecido retiniano, diminuindo a resposta de células bipolares e aumentando o tempo de resposta de fotorreceptores (bastonetes), células bipolares e amácrinas.

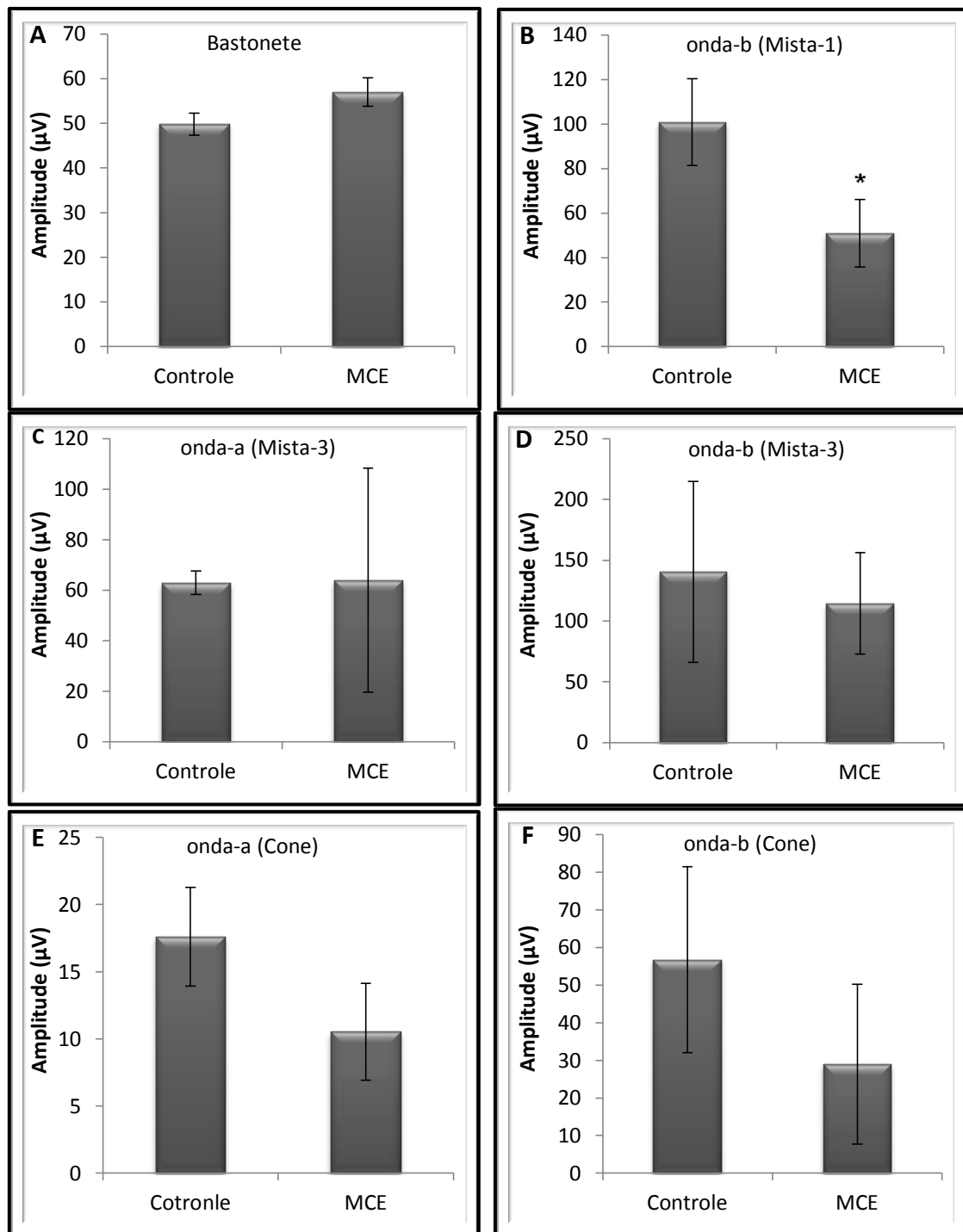


Figura 29: Amplitude de resposta do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-b de resposta isolada de bastonete; (B) onda-b de resposta mista 1; (C) onda-a de resposta de mista 3; (D) onda-b de resposta mista 3; (E) onda-a de resposta isolada de cone; (F) onda-b de resposta isolada de cone. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; $p < 0.05$ (Teste t Student).

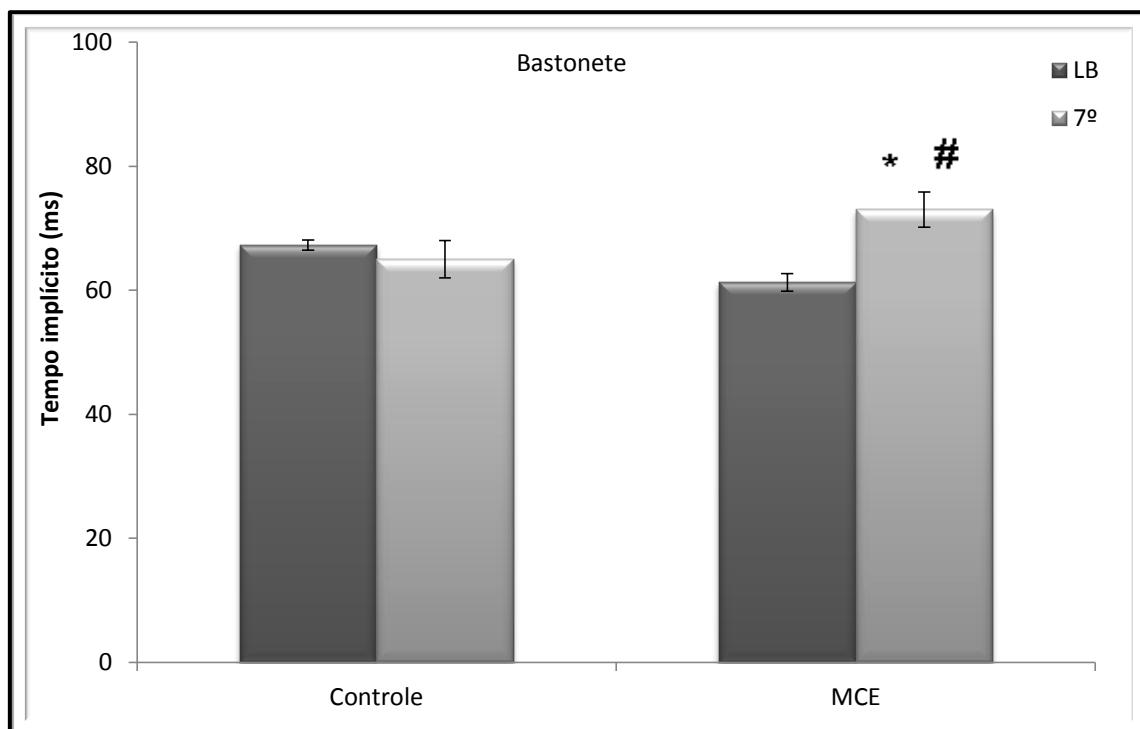


Figura 30: Tempo implícito de resposta isolada de bastonete do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE+ vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).

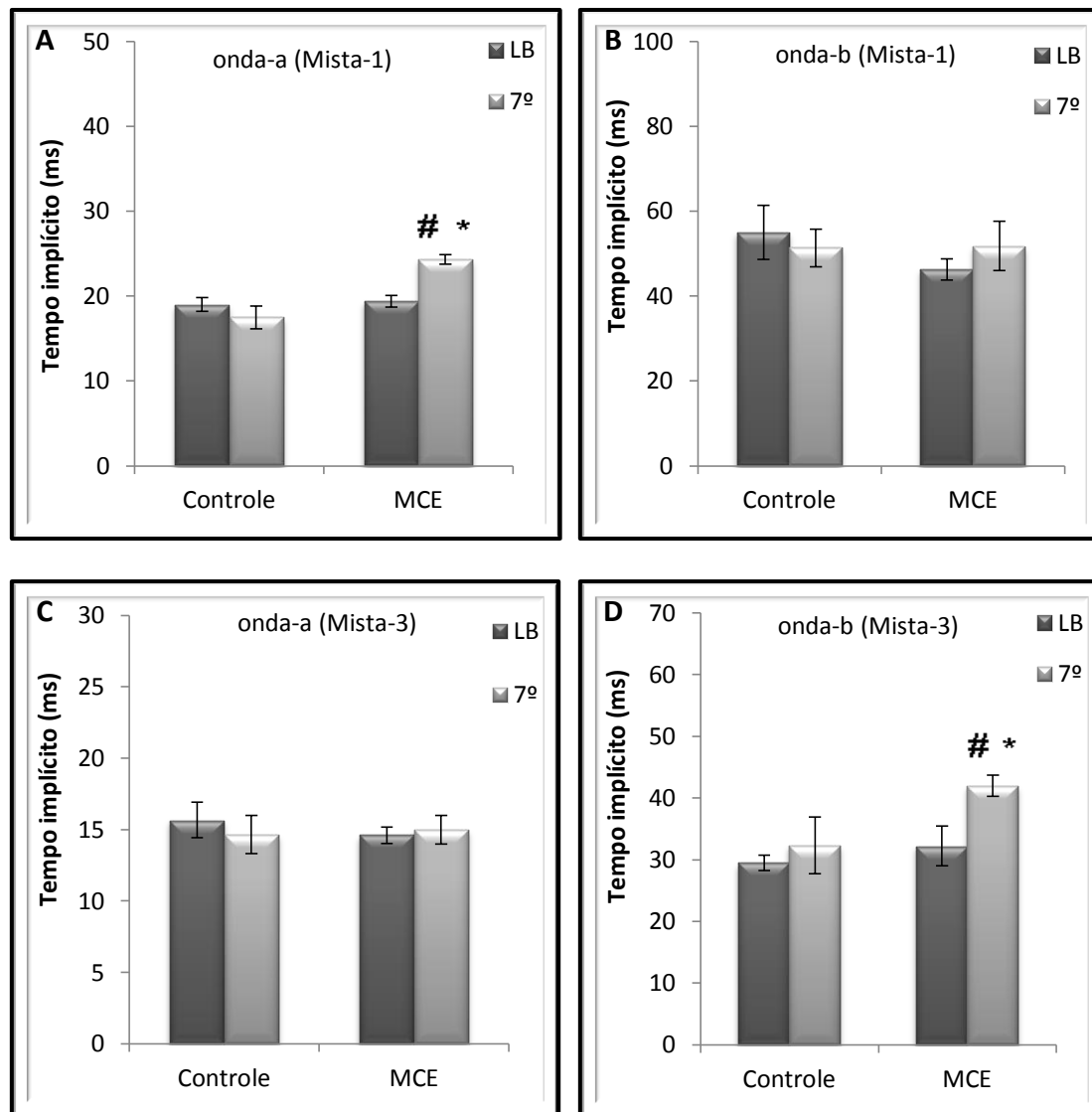


Figura 31: Tempo implícito de resposta mista (bastonete e cone) do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-a de resposta mista 1; (B) onda-b de resposta de mista 1; (C) onda-a de resposta mista 3; (D) onda-b de resposta mista 3. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE+ vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste *Tukey Kramer*).

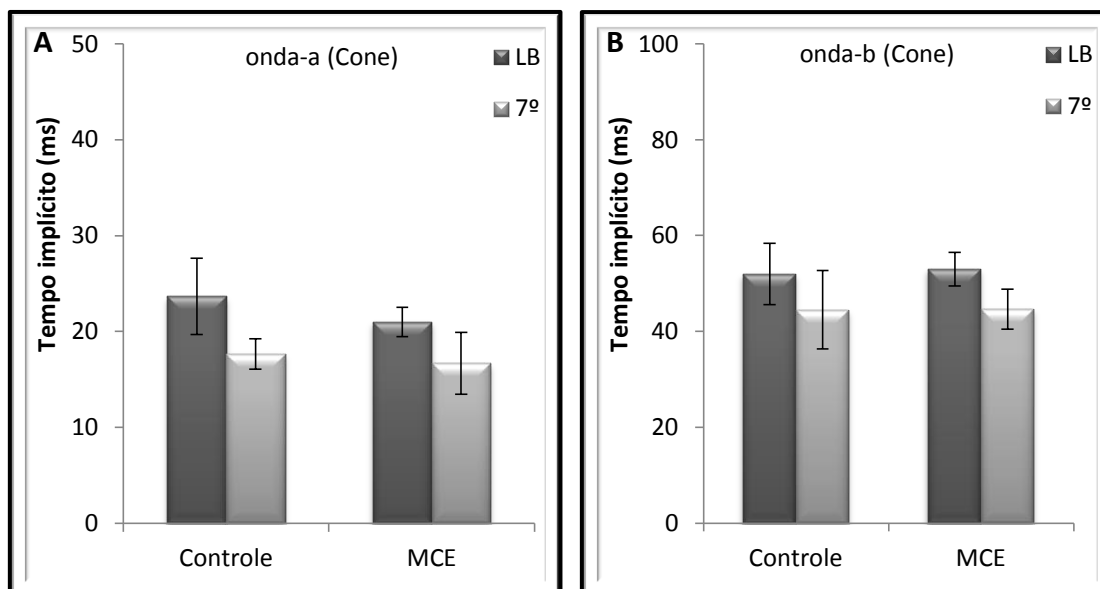


Figura 32: Tempo implícito de resposta isolada de cone do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. (A) onda-a de resposta de cone (B) onda-b de resposta de cone. Dados expressos pela média dos grupos.

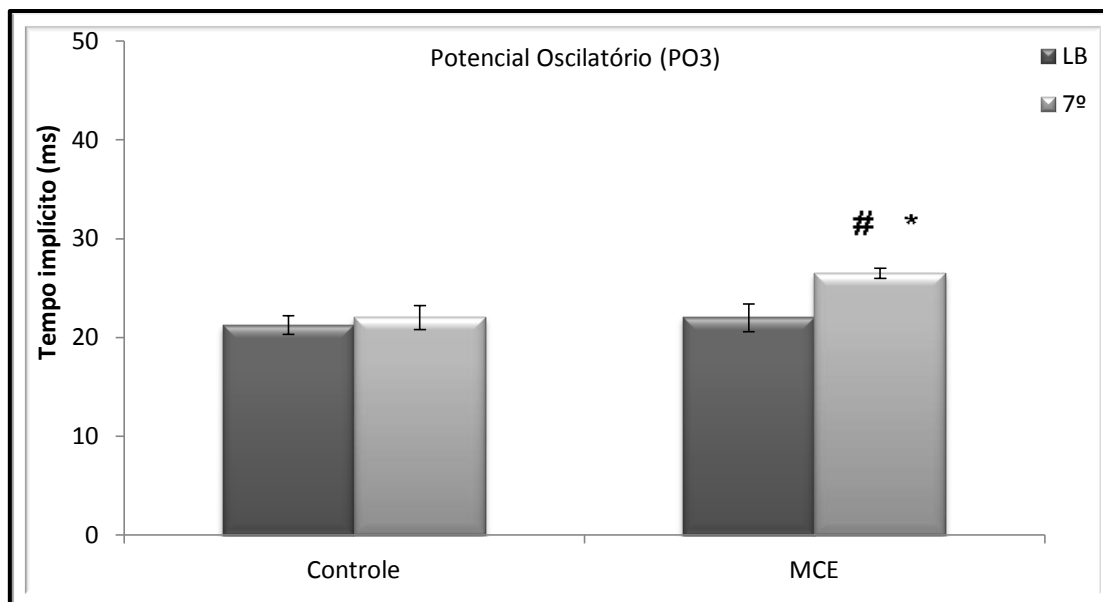


Figura 33: Avaliação do tempo implícito de resposta de potencial oscilatório do tecido retiniano de camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA. Dados expressos pela média dos grupos. * MCE vs Controle; # MCE vs MCE-; $p < 0.05$ (ANOVA, pós-teste Tukey Kramer).

5 DISCUSSÃO

A Malária Cerebral é uma doença multifatorial, que apresenta mecanismos complexos e pouco elucidados. Estudos sugerem que o desenvolvimento deste quadro encontra-se relacionado tanto com a citoaderência de eritrócitos parasitados no endotélio vascular, quanto com a indução de um processo imunológico exarcebado (Berendt et al., 1994; Carvalho et al., 2014; Combes et al., 2006; Hunt & Grau 2003; Martins et al., 2009a; Medana & Turner, 2006; Miller et al., 2002). Além disso, estudos demonstraram o desenvolvimento de uma retinopatia grave associada ao quadro da MC (Medana et al., 2001). Contudo, pouco se sabe sobre as diversas alterações que podem ocorrer no tecido retiniano devido o desenvolvimento deste quadro. Diante disso, o presente trabalho se propôs em caracterizar a resposta inflamatória bem como as alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas no tecido retiniano envolvidas na patogênese da MC.

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizou-se um modelo animal de MC, como a infecção de camundongos albino suíço com a cepa ANKA de *P. berghei* (PbA), o qual é fundamental para o desenvolvimento de estudos que buscam elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese da MC, principalmente no que diz respeito ao tecido retiniano. Em 2009, Martins et al. demonstraram, pela primeira vez, que camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA são suscetíveis a desenvolvimento do quadro de MCE, apresentando as principais características associadas a doença, como a presença dos sinais clínicos, as alterações histopatológicas do cérebro e bloqueio do fluxo sanguíneo devido a citoaderência de leucócitos parasitados no endotélio vascular.

Contudo, para avaliarmos as alterações no tecido retiniano, inicialmente foi realizado a padronização do quadro da MCE nos camundongos albino suíço inoculados com a cepa PbA, através da análise de diversos parâmetros. Nossos resultados demonstraram que os sintomas clínicos (ataxia, deficiência respiratória, desvio de cabeça, paralisia, convulsão e coma) observados após a infecção dos camundongos albino suíço com a cepa PbA se assemelham aquelas apresentadas em trabalhos anteriores utilizando modelos clássicos de MCE (Patel et al., 2008; Randall et al., 2008).

Além dos sinais clínicos, outros parâmetros como a taxa de sobrevivência e parasitemia também são comumente utilizados para caracterizar o desenvolvimento do quadro da MCE (Lacerda-Queiroz et al., 2010; Martins et al., 2009a; 2009b). Ao avaliarmos esses parâmetros em nosso trabalho observamos semelhanças ao encontrado na literatura, a qual sugere que os camundongos suscetíveis a desenvolver o quadro de MCE evoluem para óbito entre o 6^o-10^o dia após a infecção com a cepa PbA (Martins et al., 2009b). Contudo, os animais que não desenvolveram o quadro de MCE evoluíram para óbito entre o 14^o-27^o d.p.i., provavelmente desenvolvendo um quadro de anemia severa em função de uma hiperparasitemia (aproximadamente 60%) (Martins et al., 2009b). Além disso, constatou-se que no momento do óbito, os animais que foram suscetíveis a desenvolver o quadro de MCE apresentaram uma baixa parasitemia (14%) semelhante ao encontrado em outros trabalhos da literatura com o mesmo modelo (Martins et al., 2009b). Estudos apontam que o estabelecimento do quadro da MC experimental encontra-se relacionado a uma baixa inoculação de eritrócitos parasitados, e conseqüentemente, o desenvolvimento de uma baixa parasitemia destes animais (Curfs et al., 1992).

Com relação a parasitemia, foi observado que os animais que desenvolveram o quadro de MCE apresentaram maior aumento na parasitemia entre os dias 5-7 pós-infecção (aproximadamente 14%) quando comparado aos animais que não desenvolveram o quadro de MCE (aproximadamente 7%), sugerindo que a rápida progressão da parasitemia nesse período está associada à intensa ativação da resposta imunológica desencadeada pela liberação de antígenos fundamentais para o estabelecimento do quadro de MC, juntamente como a aderência dos eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, também modulada pela resposta imunológica (Miller et al., 2002).

Além da taxa de sobrevivência e parasitemia, também foi avaliado uma possível alteração no ganho de massa corpórea dos animais controle e infectados com a cepa PbA. Contudo, verificamos que não houve alteração no ganho de massa corpórea dos animais no decorrer dos dias pós-infecção, demonstrando que as alterações caracterizadas no presente trabalho não estão relacionadas com a perda de massa corpórea, visto que uma possível diminuição de massa corpórea no decorrer dos dias pós-infecção poderia comprometer nossa análise. Nesse sentido, nossos resultados corroboram o encontrado na literatura, onde Daí et al. (2012) observaram que o quadro de MC experimental não foi capaz de alterar o ganho de massa corpórea em modelo murino até o 7^º d.p.i, apresentando diminuição apenas no 9^º d.p.i. Vale ressaltar, que todas as nossas análises foram realizadas no 7^º d.p.i, sendo que não observamos diferença nos ganho de massa corpórea em nenhum dos dias pós-infecção.

Outro parâmetro avaliado neste trabalho foi a presença ou ausência de extravasamento vascular no tecido cerebral dos camundongos albino suíço infectados,

através do ensaio de permeabilidade vascular pelo uso do corante Azul de Evans. Ao avaliarmos a presença de extravasamento vascular no grupo controle e infectado observamos que 77% do grupo desenvolveram o quadro de MC experimental apresentando presença de extravasamento vascular, sendo que estudos prévios relatam que a incidência desta neuropatologia entre os camundongos infectados com PbA pode variar entre 60-100%, dependendo de características como peso e idade, do perfil genético do hospedeiro e da quantidade de eritrócitos parasitados usados no momento da inoculação (Amani et al., 1998; Bagot et al., 2002). Somado a isso, observamos a presença de diversos focos hemorrágicos distribuídos por todo o cérebro dos camundongos que desenvolveram o quadro de MC experimental, enquanto que os camundongos controle apresentaram total integridade dos vasos sanguíneos que irrigam o tecido cerebral dos mesmos, semelhantemente a outros estudos como em Schmidt et al. (2011), os quais demonstraram a presença de extravasamento vascular em camundongos com o quadro de MC experimental e ausência de extravasamento vascular em camundongos controle. De acordo com Chan-Ling et al. (1992), o aumento da permeabilidade vascular na barreira hematoencefálica (BHE) ocorre no início da infecção, antes mesmo do surgimento dos primeiros sinais clínicos, promovendo danos celulares na microvasculatura cerebral durante a progressão da malária cerebral (Neill et al., 1993).

Estudos sugerem que as principais alterações na permeabilidade da BHE no quadro de MC encontram-se relacionados com a entrada de mediadores inflamatórios e antígenos produzidos pela doença no compartimento cerebral, promovendo a ativação da microglia e degeneração dos astrócitos (Ma et al., 1997; Medana et al., 1996; 1997a, b; Deininger et al., 2002). Além disso, Schmidt et al. (2011)

demonstraram que a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias foi capaz de reverter a resistência genética que camundongos BALB-C possuem frente ao quadro de MC experimental, tornando-os suscetíveis em desenvolver o quadro, fortalecendo a hipótese de que a resposta imunológica é fundamental para a patogênese da malária cerebral.

Neste sentido, na tentativa de avaliar a participação do processo inflamatório no quadro de MC experimental, procuramos determinar e comparar a ativação de determinados componentes da resposta imunológica em ambos os tecidos cerebral e retiniano de camundongos controle e infectado com a cepa PbA.

A produção de antígenos promovida pelo desenvolvimento do quadro da MC induz a ativação do sistema imunológico, principalmente dos monócitos, os quais são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (Nebl et al., 2005), sendo que alguns estudos já demonstraram que o TNF- α e IL-6 encontram-se em níveis aumentados no tecido cerebral de animais inoculados com a cepa PbA (Omer et al., 2000). Além disso, a liberação de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 possui um papel protetor regulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao parasito (Kossodo et al., 1997). No entanto, pouco se sabe sobre a ativação destes componentes no tecido retiniano também acometido por esta patologia.

No presente trabalho, observamos que no tecido cerebral os níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 encontram-se elevados, o que caracteriza uma intensa resposta inflamatória no cérebro durante o quadro de MC experimental. Ratificando nossos resultados, Campos et al. (2015) demonstraram o aumento dos níveis de TNF- α ,

IL-6 e IL-10 nas regiões pré-frontal do córtex e hipocampo de camundongos com o quadro de MC experimental.

Por outro lado, no tecido retiniano pouco se sabe sobre a liberação destas citocinas antes e durante o quadro de MC experimental. Desta forma, avaliando os níveis de TNF- α e IL-6 na retina, observamos que a produção destas citocinas não são detectáveis durante o desenvolvimento do quadro de MC, diferente do que observamos no tecido cerebral. Contudo, ao avaliarmos os níveis de IL-10, observamos que a produção desta citocina aumenta no 7º d.p.i, em camundongo que desenvolveram o quadro de MC experimental. O resultado em questão caracteriza a ausência da resposta inflamatória, via produção de TNF- α e IL-6 no tecido retiniano. Sugerindo que o aumento nos níveis de citocinas antiinflamatórias esteja regulando essa resposta modulando a produção tanto de TNF- α quanto de IL-6, demonstramos que no quadro de malária cerebral, as possíveis alterações na retina induzidas pelo processo infeccioso independem de uma ativação inflamatória.

Uma vez padronizado o quadro de MC experimental nos camundongos albinos suíços utilizados no presente trabalho, foi possíveis avaliar as prováveis alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas do tecido retiniano dos animais com quadro de MC experimental, visto que estudos demonstraram o desenvolvimento de uma retinopatia associada a doença, bem como um intenso processo de astrogliose, (Medana et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que a perda de funcionalidade dos astrócitos pode resultar na alteração da atividade neuronal da retina (Medana et al., 1997b; Hunt et al., 2006).

No tecido retiniano, os astrócitos, juntamente com as glias de Muller e microglia possuem fundamental importância por promover a homeostasia do tecido,

principalmente com relação aos sistemas de neurotransmissão. Dentre os principais sistemas de neurotransmissão, destacam-se o sistema glutamatérgico, principal via excitatória, e o sistema gabaérgico, principal via inibitória do tecido retiniano (Quinlan et al., 1999; Shigeri et al., 2004; Yang, 2004).

Ao avaliarmos os níveis extracelulares de glutamato e GABA, observou-se que no tecido retiniano de camundongos com o quadro de MC experimental ocorreu o aumento da liberação de glutamato. Esse efeito não foi observado com relação aos níveis do neurotransmissor GABA. Estes resultados Corroboram com encontrado na literatura, onde Miranda et al. (2010), demonstraram que no tecido cortical de camundongos C57Bl/6 ocorre um aumento na liberação do glutamato no 6º d.p.i., sendo que esse efeito está intimamente associado aos sintomas comportamentais apresentados no quadro de MC experimental.

Além disso, de acordo com Oliveira et al. (2010), o glutamato é retirado da fenda sináptica, fundamentalmente, por dois diferentes mecanismos, um dependente e outro independente de Na⁺. Nesse sentido, observamos em nossos resultados, que na retina dos camundongos com MC Experimental houve um aumento no transporte de glutamato no 7º d.p.i. Nesse contexto, Ward et al., (2005) demonstraram que em patologias que acometem o tecido retiniano como a retinopatia diabética destaca-se um significativo aumento na funcionalidade de transportadores como o GLAST e o EAAT4, evidenciado pela forte e intensa marcação de D-aspartato (análogo do glutamato) nas células de Müller deste tecido. Entretanto, importante destacar que a elevada atividade destes transportadores não é acompanhada pelo aumento da sua expressão nesta condição patológica.

O aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica é capaz de promover a intensa estimulação de receptores pós-sinápticos, desencadeando morte celular por excitotoxicidade, característico de inúmeras desordens neurológicas e processos isquêmicos (Hazell, A., 2009; Sheldon & Robinson, 2007; Suemori et al., 2006). Contudo, observamos um aumento da captação de glutamato, sugerindo que o excesso de glutamato na fenda sináptica promoveu o aumento da funcionalidade dos transportadores responsáveis por remover este neurotransmissor do meio extracelular.

Sabendo que os sistemas de neurotransmissão são fundamentais para o funcionamento do tecido retiniano, tornou-se fundamental a caracterização de possíveis alterações na funcionalidade da retina. Nesse sentido, no presente trabalho, observou-se uma diminuição na amplitude de reposta de *onda-b*, referente a células bipolares (neurônios de segunda ordem) e células de Muller em comunicação com cones e bastonetes. Esse resultado encontra-se de acordo com o que foi apresentado com relação ao sistema glutamatérgico, onde ocorre o aumento na liberação de glutamato, visto que quando os fotorreceptores são estimulados, os mesmos respondem hiperpolarizando, cessando a liberação de glutamato na fenda sináptica (Kolb, H. 2003). Além disso, Byung-Jin et al. (2013), fortalecem os nossos resultados, demonstrando que, em modelo de isquemia em camundongo (7 dias após a indução), ocorre diminuição de *onda-a* e *onda-b* em respostas mistas (cones e bastonetes) de diferentes intensidades.

O quadro de MC apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como um estado de coma associado à complicações neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos. As microhemorragias, por sua vez, são resultantes do seqüestro de

eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral e do conseqüente dano endotelial (Chen et al., 2000). No cérebro, a obstrução vascular causada pela aderência dos eritrócitos no endotélio pode levar a processos isquêmicos com surgimento de hemorragias petequiais, que são os principais responsáveis pelo estado de coma na MC (Berendt et al., 1994).

Outro parâmetro importante para análise da funcionalidade da retina encontra-se relacionado com o tempo que as células utilizam para responder ao estímulo (tempo implícito). Nesta análise, podemos observar que o quadro de MC experimental aumentou o tempo implícito em respostas isoladas de bastonetes, respostas mistas (cones e bastonetes) e potencial oscilatório (células amácrinas). Estes se assemelham ao encontrado na literatura, onde Byung-Jin et al. (2013), que demonstraram, em modelo de isquemia em camundongo, aumento no tempo implícito de respostas mistas em diferentes intensidades. Sugerindo que, quadros classicamente isquêmicos, como a malária cerebral, podem desenvolver alterações na funcionalidade do tecido retiniano, alterando tanto a quantidade de células responsivas quanto o tempo que essas células demoram em responder ao estímulo luminoso.

A isquemia retiniana é responsável por ocasionar alterações visuais em diversas patologias, como oclusão vascular retiniana, retinopatia diabética, glaucoma e trauma ocular (Bek, T. 2009). É causada por uma redução do fluxo sanguíneo, diminuindo a suplementação de oxigênio e outros nutrientes para as diferentes camadas da retina. A reperusão do sangue seguido de um quadro isquêmico encontra-se relacionado a geração de estresse oxidativo e resposta inflamatória (Osborne et al., 2004), resultando na morte de células ganglionares por diferentes mecanismos, incluindo necrose e apoptose. (Piras et al., 2011). Além disso, o dano retiniano promovido por

esta doença está associado, também, a perda de neurônios, degeneração morfológica da retina, perda de funcionalidade, e finalmente perda de visão (Russo et al., 2008). Esses estudos fortalecem nossos resultados, visto que, mesmo sendo pouco elucidada, a patogênese da MC encontra-se relacionada com o bloqueio do fluxo sanguíneo devido a citoaderencia de eritrócitos parasitados, seguido de hipóxia aguda do tecido, apresentando quadros isquêmicos (Chen et al., 2000). Entretanto, poucos estudos buscam elucidar as possíveis alterações desencadeadas no tecido retiniano induzidas pelo desenvolvimento do quadro de MC.

Assim, este trabalho, caracterizou, pela primeira vez, as alterações neuroquímicas e eletrofisiológicas desencadeadas no tecido retiniano de camundongos albinos suíços que desenvolveram o quadro de MC experimental, destacando a ausência de um processo inflamatório exarcebado. Além disso, mesmo sendo pouco elucidados os principais mecanismos envolvidos nessas alterações, este estudo se apresenta de enorme valia para comunidade científica para a melhor compreensão do desenvolvimento do quadro de malária cerebral.

6 CONCLUSÃO

- A infecção por PbA apresenta um curso agudo e letal na linhagem de camundongo albino suíço, com manifestações clínicas mais evidentes entre o 6º e 9º dia após a infecção, momento em que a parasitemia permanecia em níveis baixos, em torno de 14%.

- Elucidamos a presença de extravasamento vascular no córtex de camundongos albinos suíços que desenvolveram o quadro de MC experimental e ausência de extravasamento nos animais que não desenvolveram o quadro.

- Durante o desenvolvimento do quadro de MCE, os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10 aumentaram no tecido cerebral, no entanto, na retina os níveis desta citocina mantiveram-se baixos, exceto IL-10 que se apresentou elevado, caracterizando a ausência de resposta inflamatória neste tecido.

- Durante o decorrer da infecção houve um aumento na captação e liberação de glutamato dependente de Na⁺ no tecido retiniano, demonstrando o envolvimento dos sistemas de transporte de aminoácidos nesta patologia.

- O quadro de MC experimental não alterou os níveis de GABA extracelular no tecido retiniano de camundongos albino suíço.

- Caracterizamos as alterações na funcionalidade do tecido retiniano, através da diminuição na amplitude do componente de *onda-b* de respostas mistas (cones e bastonetes), assim como aumento no tempo implícito de respostas isoladas de bastonetes, mistas (cones e bastonetes) e potencial oscilatório.

- O quadro de MC experimental não alterou a amplitude de resposta e nem o tempo implícito para respostas de cones.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, S.; BROWN, H.; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? **Trends in Parasitology**, 18(8): 360-6, 2002.

AMANI, V.; BOUBOU, M.I.; PIED, S.; MARUSSIG, M.; WALLIKER, D.; MAZIER, D.; RÉNIA, L. Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, 66(9): 4093-9, 1998.

BAGOT, S.; IDRISSE-BOUBOU, M.; CAMPINO, S.; BEHRSCHEMIDT, C.; GORGETTE, O.; GUÉNET, J.L.; PENHA-GONÇALVES, C.; MAZIER, D.; PIED, S.; CAZENAVE, P.A. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. **Infection and Immunity**, 70(4): 2049-56, 2002.

BAKER, D.A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 172: 57-65, 2010.

BARNSTABLE, C.J. Glutamate and GABA in retinal circuitry. **Current Opinion in Neurobiology**, 3(4):520–525, 1993.

BEARE, N.A.V.; TAYLOR, T.E.; HARDING, S.P.; LEWALLEN, S.; MOLYNEUX, M.E. Malarial retinopathy; a newly established diagnostic sign in severe malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75(5): 790-797, 2006.

BEK T: Inner retinal ischaemia: current understanding and needs for further investigations. **Acta Ophthalmologica**, 87:362–367, 2009.

BERENDT, A.R.; TURNER, G.D.H.; NEWBOLD, C.I. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, 10: 412-414, 1994.

BONDI, F.S. The incidence and outcome of neurological abnormalities in childhood cerebral malaria: a long-term follow-up of 62 survivors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(1): 17-9, 1992.

BOYSEN, K.E. & MATUSCHEWSKI, E. Inhibitor of Cysteine Proteases Is Critical for Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. **mBio**, 4(6): e00874-13, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-54, 1976.

BRAMALL, A.N.; WRIGHT, A.F.; JACOBSON, S.G.; McINNES, R.E. The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. **Annuals Reviews in Neuroscience**, 33; 441-472, 2010.

BRAZ, R.M.; DUARTE, E.C.; TAUIL, P.L. Characteristics of malaria epidemics in the municipalities of the Brazilian Amazon, **Cadernos Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 29(5): 935-944, 2013.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M.; IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J.; REICHENBACH, A. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. **Neurochemistry International**, 54: 143-60, 2009.

BROWN, H.; TURNER, G.; ROGERSON, S.; TEMBO, M.; MWENECHANYA, J.; MOLYNEUX, M.; TAYLOR, T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, 180(5): 1742-6, 1999.

BYUNG-JIN, K.; TERRY, A.B.; ROBERT, J.W.; ABBOT, F C. Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal

regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice.

Molecular Neurodegeneration, 8:21, 2013.

CAMPOS, A.C.; BRANT, F.; MIRANDA, A.S.; MACHADO, F.S.; TEIXEIRA, A.L.
Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine
model of cerebral malaria. **Neuroscience**, ARTICLE IN PRESS, 2015.

CARRASCO, M.C.; NAVASCUÉS, J.; CUADROS, M.A.; CALVENTE, R.; MARTÍN-
OLIVA, D.; SANTOS, A.M.; SIERRA, A.; FERRER-MARTÍN, R.S.; MARÍN-TEVA, J.L.
Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures.
Developmental Neurobiology, 71(4): 296-315, 2011.

CARVALHO, L.J.M.C.; MOREIRA, A.S.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; MARTINS, Y.C.
Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. **Mem Inst
Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Vol. 109(5): 577-588, 2014.

CHANG-LING, T.; NEILL, A.L.; HUNT, N.H. Early Microvascular Changes in Murine
Cerebral Malaria Detected in Retinal Wholemounds. **American Journal of Pathology**,
Vol. 140, No. 5, 1992.

CHEN, Q.; SCHLICTHERLE, M.; WAHLGREN, M. Molecular aspects of severe
malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, 13(3): 439-50, 2000.

COMBES, V.; DE SOUZA, J.B.; RÉNIA, L.; HUNT, N.H.; GRAU, G.E. Cerebral
malaria: which parasite? Which model? **Inflammation and Infectious Diseases**, 2(2):
141-147, 2005.

COMBES, V.; COLTEL, N.; FAILLE, D.; WASSMER, S.C.; GRAU, G.E. Cerebral
malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood–brain barrier.
International Journal for Parasitology, 36: 541–546, 2006.

CURFS, J.H.; HERMSEN, C.C.; MEUWISSEN, J.H.; ELING, W.M. Immunization against cerebral pathology in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Parasitology**, 105: 7-14, 1992.

DAI, M.; FREEMAN, B.; BRUNO, F.P.; SHIKANI, H.J.; TANOWITZ, H.B.; WEISS, L.M.; REZNIK, S.E.; STEPHANI, R.A.; DESRUISSEAU, M.S. The novel ETA receptor antagonist HJP-272 prevents cerebral microvascular hemorrhage in cerebral malaria and synergistically improves survival in combination with an artemisinin derivative. **Life Sciences**, 91(13-14): 687–692, 2012.

DELYFER, M.N.; FORSTER, V.; NEVEUX, N.; PICAUD, S.; LE´ VEILLARD, T.; SAHEL, J.A. Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. **Molecular Vision**, 11: 88–696, 2005.

DE SOUZA, J.B. & RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, 4: 291-300, 2002.

DEVRIES, S.H. Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. **Neuron**, 28: 847–856, 2000.

EKSI, S.; CZESNY, B.; VAN GEMERT, G.J.; SAUERWEIN, R,W.; ELING, W.; WILLIAMSON, K.C. Malaria transmission-blocking antigen, Psf 230, mediates human red blood cells binding to exflagellating male parasites and oocyst production. **Molecular Microbiology**, 61: 991-8, 2006.

EULER, T.; SCHNEIDER, H.; WÄSSLE, H. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. **The Journal of Neuroscience** , 16: 2934– 2944, 1996.

FREVERT, U.; SINNIS, P.; CERAMI, C.; SHREFFLER, W.; TAKACS, B.; NUSSENZWEIG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, 177: 1287–1298, 1993.

GASS, J.D. Stereoscopic Atlas of Macular Diseases: Diagnosis and Treatment. **Mosby, St. Louis, MO**, p: 1061, 1997.

GOOD, M.F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C.R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**, 23: 69-99, 2005.

HALDAR, K.; MURPHY, F.C.; MILNER, D.A.; TAYLOR, T.E. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology**, 2: 217-49, 2007.

HARAZNY, J.; SCHOLZ, M.; BUDER, T.; LAUSEN, B.; KREMERS, J. Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse. **Documenta Ophthalmologica**, 119:181–197, 2009.

HAZELL, A.S. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. **Neurochemistry International**, 55: 129–135, 2009.

HAYDER, H.C.V.; NOLAN, J.; COMBES, V.; GRAMAGLIA, I.; GRAU, G.E. A unified hypothesis for the Genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **TRENDS in Parasitology**, Vol.22 No.11, 2006.

HOLCOMBE, D.J.; LENGEFELD, N.; GOLE, G.A.; BARNETT, N.L. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport. **Acta Ophthalmologica**, 86: 408–414, 2008.

HUNT, N.H. & GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **TRENDS in Immunology**, 24(9): 491-499, 2003.

HUNT, N.H.; GOLENSER, J.; CHAN-LING, T.; PAREKH, S.; RAE, C.; POTTER, S.; MEDANA, I.M.; MIU, J.; BALL, H.J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, 36: 569-582, 2006.

IDRO, R.; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **Lancet Neurology**, 4(12): 827-40, 2005.

JOHNSON, J.; CHEN, T.K.; RICKMAN, D.W.; EVANS, C.; BRECHA, N.C. Multiple gamma-Aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina. **Journal of Comparative Neurology**, 375: 212–224, 1996.

JUNIOR, S.G.L.; PAMPLONA, V.M.S.; CORVELO, T.C.O.; RAMOS, E.M.L.S. Quality of life and the risk of contracting malaria by multivariate analysis in the Brazilian Amazon region. **Malaria Journal**, 13: 86, 2014.

KAMADA, Y.; MIZUNO, A.; MATSUDA, M. Effect of L-glutamic acid on [14C]GABA release from isolated rat retina. **Brain Res**, 229: 251–255, 1981.

KIRCHGATTER, K. & DEL PORTILLO, H.A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77(3): 455-475, 2005.

KOLB, H. How the retina works. **American Scientist**, v. 91, p. 28-35, 2003.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, 91(4): 536-40, 1997.

KREMSNER, P.G.; GRUNDMANN, H.; NEIFER, S.; SILWA, K.; SAHLMÜLLER, G.; HEGENSCHIED, B.; BIENZLE, U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. **Journal of infectious diseases**, 164: 605-8, 1991.

KUSAKA, S.; KAPOUSTA-BRUNEAU, N.V.; PURO, D.G. Plasma-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells: role of glutamate. **Glia**, 25, 205–215, 1999.

LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.; CAMARGOS, E.R.; CARVALHO, L.J.; HOWE, C.L.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. **Experimental Parasitology**, 125(3): 271-8, 2010.

LAMB, T.J.; BROWN, D.E.; POTOCHNIK, A.J.; LANGHORNE, J. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 8(6): 1-22, 2006.

LAMBA, D.; KARL, M.; REH, T. Neural Regeneration and Cell Replacement: A View from the Eye. **Cell Stem Cell**, 2: 538:549, 2008.

LEWALLEN, S.; BRONZAN, R.N.; BEARE, N.A.; HARDING, S.P.; MOLYNEUX, M.E.; TAYLOR, T.E. Using malarial retinopathy to improve the classification of children with cerebral malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 102(11): 1089-94, 2008.

LOCHHEAD, J.; MOVAFFAGHY, A.; FALSINI, B.; HARDING, S.; RIVA, C.; MOLYNEUX, M. The effects of hypoxia on the ERG in paediatric cerebral malaria. **Eye**, 24(2): 259-64, 2010.

LOU, J.; GASCHE, Y.; ZHENG, L.; CRITICO, B.; MONSO-HINARD, C.; JUILLARD, P.; MOREL, P.; BUURMAN, W.A.; GRAU, G.E. Differential reactivity of brain microvascular endothelial cells to TNF reflects the genetic susceptibility to cerebral malaria. **European Journal of Immunology**, 28(12): 3989-4000, 1998.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G.E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4): 810-820, 2001.

MA, N.; MADIGAN, M.C.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Compromised bloodnerve barrier, astrogliosis, and myelin disruption in optic nerves during fatal murine cerebral malaria. **Glia**, 19(2): 135-51, 1997.

MAEGRAITH, B. Pathological Processes in Malaria and Blackwater Fever. **Blackwell**, 1948.

MARCHIAFAVA, E. & BIGNAMI, A. Sulle Febbri Estivo Aumnali. E. Loescher, 1894.

MARTINS, Y.C.; CARVALHO, L.J.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: lessons from the human disease and the experimental murine models. **Neuroimmunomodulation**, 16: 134-145, 2009a.

MARTINS, Y.C.; SMITH, M.J.; PELAJO-MACHADO, M.; WERNECK, G.L.; LENZI, H.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; CARVALHO, L.J.M.C. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. **International Journal of Experimental Pathology**, 90(2): 119–130, 2009b.

MAUDE, R.J.; DONDORP, A.M.; SAYEED, A.A.; DAY, N.P.J.; WHITE, N.J.; BEARE, N.A.V. The eye in cerebral malaria: what can it teach us? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 103(7): 661-664, 2009.

McKENZIE, F.E.; SMITH, D.L.; O'MEARA, W. P.; RILEY, E.M. Strain Theory of Malaria: the first 50 years. **Advances in Parasitology**, 66: 1-46, 2008.

MEDANA, I.M.; CHAN-LING, T.; HUNT, N.H. Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to disruption of the blood-brain barrier. **Glia**, 16:51-64, 1996.

MEDANA, I.M.; HUNT, N.H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. **Glia**, 19: 91-103, 1997a.

MEDANA, I.M.; HUNT, N.H.; CHAUDHRI, G. Tumor Necrosis Factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **American Journal of Pathology**, 150(4): 1473-1486, 1997b.

MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G., CHAN-LING, T., HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: "innocent bystander" or active participant in the induction of immunopathology. **Immunology and Cell Biology**, 79: 101- 120, 2001.

MEDANA, I.M.; DAY, N.P.; SALAHIFAR-SABET, H.; STOCKER, R.; SMYTHE, G.; BWANAISA, L.; NJOBVU, A.; KAYIRA, K.; TURNER, G.D.; TAYLOR, T.E.; HUNT, N.H. Metabolites of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in the cerebrospinal fluid of Malawian children with malaria. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 188, 844–849, 2003.

MEDANA, I.M.; TURNER, G.D. Human cerebral malaria and the blood brain barrier. **International Journal for Parasitology**, 36(5): 555-68, 2006.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.J.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, 415: 673-679, 2002.

MIRANDA, A.S; VIEIRA, L.B.; LACERDA-QUEIROZ, N.; SOUZA, A.H.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; GOMEZ, M.V.; MACHADO, F.S.; RACHID, M.A.; TEIXEIRA, A.L. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with

behavioral symptoms in experimental malaria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 43: 1173-1177, 2010.

MORAES, E.R.; GRISOLIA, A.B.; OLIVEIRA, K.R.; PICANÇO-DINIZ, D.L.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MAXIMINO, C.; BATISTA, E.J.; HERCULANO, A.M. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 15;907: 1-6, 2012.

MOTA, M.M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.P.; HAFALLA, J.C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUÉZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infections. **Science**, 291: 141-4, 2001.

NEBL, T. et al. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. **Parasitology**, 130 (Suppl.), S45–S62, 2005.

NEILL, A.L. & HUNT, N.H. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology**, 105(Pt 2), 165–175, 1992.

O'BRIEN, D.F. The chemistry of vision. **Science**, 218: 961–966, 1982.

OLIVEIRA, K.R.M.; HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Pharmacological characterization of glutamate Na⁺-independent transport in retinal cell cultures: Implications in the glutathione metabolism. **Neurochemistry International**, 56: 59–66, 2010.

OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.; RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? **Parasitology Today**, 16(1): 18-23, 2000.

OSBORNE, N.N.; CASSON, R.J.; WOOD, J.P.; CHIDLOW, G.; GRAHAM, M.; MELENA, J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. **Progress in Retinal and Eye Research**, 23:91–147, 2004.

O'SHEA, R.D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 29: 1018-1023, 2002.

PATEL, S.N.; BERGHOUT, J.; LOVEGROVE, F.E.; AYI, K.; CONROY, A.; SERGHIDES, L.; MIN-OO, G.; GOWDA, D.C.; SARMA, J.V.; RITTIRSCH, D.; WARD, P.A.; LILES, W.C.; GROS, P.; KAIN, K.C. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, 205(5): 1133-43, 2008.

PIRAS, A.; GIANETTO, D.; CONTE, D.; BOSONE, A.; VERCELLI, A. Activation of autophagy in a rat model of retinal ischemia following high intraocular pressure. **PLoS One**, 6:e22514, 2011.

POW, D.V.; BALDRIDGE, W.; CROOK, D.K. Activitydependent transport of GABA analogues into specific cell types demonstrated at high resolution using a novel immunocytochemical strategy. **Neuroscience**, 73: 1129–1143, 1996.

POW, D.V.; BARNETT, N.L.; PENFOLD, P. Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis? **Neurochemistry International**, 37: 191- 198, 2000.

POW, D.V. Amino acids and their transporters in the retina. **Neurochemistry International**, 38: 463-484, 2001a.

POW, D.V. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. **Glia**, 34: 27-38, 2001b.

QUINLAN, E.M.; PHILPOT, B.D.; HUGANIR, R.L.; BEAR, M.F. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. **Nature Neuroscience**, 2: 352-357, 1999.

RANDALL, L.M.; AMANTE, F.H.; MCSWEENEY, K.A.; ZHOU, Y.; STANLEY, A.C.; HAQUE, A.; JONES, M.K.; HILL, G.R.; BOYLE, G.M.; ENGWERDA, C.R. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. **Infection and immunity**, 76(7): 3312-20, 2008.

RAMÓN Y CAJAL, S. Lá Retine de vertebrés. **La cellule**, 9: 119-257, 1892.

RAUEN, T.; ROTHSTEIN, J.D.; WÄSSLE, H. Differential expression of the three glutamate transporter subtypes in the rat retina. **Cell Tissue Research**, 286: 325-336, 1996.

RAUEN, T. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. **Amino Acids**, 19: 53-62, 2000.

RUSSO, R.; CAVALIERE, F.; BERLIOCCI, L.; NUCCI, C.; GLIOZZI, M.; MAZZEI, C.; TASSORELLI, C.; CORASANITI, M.T.; ROTIROTI, D.; BAGETTA, G.; MORRONE, L.A. Modulation of prosurvival and death-associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade. **Journal of Neurochemistry**, 107: 1347–1357, 2008.

SACHS, J. & MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, 415: 680-5, 2002.

SAYEED, A.A.; MAUDE, R.J.; HASAN, M.U.; MOHAMMED, M.; HOQUE, M.G.; DONDORP, A.M.; FAIZ, M.A. Malaria retinopathy in Bangladeshi adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84(1): 141-147, 2011.

SCHMIDT, K.E.; SCHUMAK, B.; SPECHT, S.; DUBBEN, B.; LIMMER, A.; HOERAUF, A. Induction of pro-inflammatory mediators in *Plasmodium berghei* infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. **Microbes and Infection**, 13(10): 828-36, 2011.

SCHOFIELD, L. & GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, 5(9): 722-35, 2005.

SENALDI, G.; SHAKLEE, C.L.; GUO, J.; MARTIN, L.; BOONE, T.; MAK, T.W.; ULICH, T.R. Protection against the mortality associated with disease models mediated by TNF and IFN-gamma in mice lacking IFN regulatory factor-1. **The Journal of Immunology**, 163: 6820-26, 1999.

SHELDON, A.L. & ROBINSON, M.B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochemistry International**, 51, 333–355, 2007.

SHIGERI, Y.; SEAL, R.P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters EAATs and VGLUTs. **Brain Research Reviews**, 45: 250-265, 2004.

SNOW, R.W.; GUERRA, C.A.; NOOR, A.M.; MYINT, H.Y.; HAY, S.I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, 434: 214-7, 2005.

SUEMORI, S.; SHIMAZAWA, M.; KAWASE, K.; SATOH, M.; NAGASE, H.; YAMAMOTO, T.; HARA, H. Metallothionein, an endogenous antioxidant, protects against retinal neuron damage in mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 47, 3975–3982, 2006.

SULLIVAN, D. Uncertainty in mapping malaria epidemiology: implications for control. **Epidemiologic Reviews**, 32: 175-187, 2010.

SUN, H.; CROSSLAND, W.J. Quantitative assessment of localization and colocalization of glutamate, aspartate, glycine, and GABA immunoreactivity in the chick retina. **The Anatomical Record**, 260(2):158–179, 2000.

TACHIBANA, M.; KANEKO, A. Retinal bipolar cells receive negative feedback input from GABAergic amacrine cells. **Visual Neuroscience**, 1(3): 297–305, 1988.

TURNER, G.D.H.; MORRISON, H.; JONES, M.; DAVIS, T.M.; LOOARESUWAN, S.; BULEY, I.; GATTER K.C.; NEWBOLD, C.I.; PUKRITAYAKAMEE, S.; NAGACHINTA, B.; WHITE, N.J.; BERENDT, A.R. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. *The American Journal of Pathology*, 145, 1057–1069, 1994.

TUTEJA, R. Malaria: an overview. **FESB Journal**, 274: 4670-4679, 2007.

WALTHER, B. & WALTHER, M. What does it take to control malaria? **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 101(8): 657-72, 2007.

WARD, M.M.; JOBLING, A.I.; KALLONIATIS, M.; FLETCHER, E.L. Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. **Diabetologia**, 48(2); 351-60, 2005.

WHEELER, D.L.; CHAPPEY, C.; LASH, A.E.; LEIPE, D.D.; MADDEN, T.L.; SCHULER, G.D.; TATUSOVA, T.A.; RAPP, B.A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research: Oxford Journals*, 28(1): 10-4, 2000.

WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. **Lancet**; 383: 723–35, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report**, 2011; 2014.

YANG, XIONG-LI. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Progress in Neurobiology**, 73: 127–150, 2004.

YAZULLA, S. GABAergic mechanisms in the retina. In: Osborne NN, Chader GJ eds. *Progress in Retinal Research*. **New York: Pergamon Press**, p 1–51, 1986.