



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

**A INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* (ANKA) INDUZ UM
QUADRO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO
DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA**

NAYARA KAUFFMANN

BELÉM/PA

2024

NAYARA KAUFFMANN

**A INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* (ANKA) INDUZ UM
QUADRO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO
DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA**

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

Orientador (a): Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

Co-Orientador: Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.

BELÉM/PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- K21i Kauffmann, Nayara.
A infecção por *Plasmodium berghei* (ANKA) induz um quadro de encefalopatia hepática em modelo murino de malária não complicada / Nayara Kauffmann. — 2024.
94 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Coorientador(a): Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Belém, 2024.
1. Malária não complicada. 2. Fígado. 3. Amônia. 4. Sistema nervoso central. I. Título.

CDD 571.6

NAYARA KAUFFMANN

**A INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* (ANKA) INDUZ UM
QUADRO DE ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO
DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA**

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr^a. Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Membro da Banca: Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Universidade Federal do Pará/Núcleo de Medicina Tropical - UFPA.

Membro da Banca: Prof. Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Membro da Banca: Prof. Dr^a. Juliana Silva Cassoli
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

BELÉM/PA
2024

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação da Prof^a. Dr^a. Karen Renata Herculano Matos Oliveira. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa (Fapespa).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a pessoa mais importante da minha vida, minha mãe Glória. Que contribuiu para minha formação e confiou no meu potencial. Esteve presente em todos os momentos, bons ou ruins, nesta fase da minha vida. Agradeço por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder a felicidade desta conquista, me dando saúde e força para trabalhar a cada dia.

Agradeço a minha mãe, Glória Kauffmann, pelo apoio, incentivo e pelo exemplo de mulher guerreira, determinada e otimista.

Agradeço a minha família que sempre esteve presente em minha vida, me dando apoio e sempre me incentivando.

Gostaria de agradecer em especial a minha orientadora Prof.^a Dr^a. Karen Oliveira, por ter me permitido fazer parte do laboratório e me mostrar o mundo ciência. Obrigada pelos seus ensinamentos, profissionalismo e apoio, foram de fundamental importância para o meu crescimento profissional.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Herculano por todos os ensinamentos, contribuições e discussões sobre o meu trabalho.

Aos professores, Dr. Evander Batista, Dra. Gilmara bastos, Dra. Juliana Cassoli, Dr. Alan Grisólia, agradeço por todas as críticas e contribuições desde o plano até a defesa da minha tese de doutorado.

Agradeço ao grupo de pesquisa da malária, Brenda Ataíde, Larissa Medeiros, Nívia Franco e Laiane Sousa pelo apoio e por todas as contribuições e discussões, sem dúvida vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, em especial a Dra. Luana Leão que me acompanha nesta jornada desde 2014 e foi de fundamental importância na minha vida acadêmica.

Agradeço ao Bioterista Amarildo Gomes, pela ajuda nos cuidados aos animais utilizados no presente trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESPA, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

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

Meu muito obrigada a todos!

“Você pode passar a vida impondo limites ou passar a vida desafiando todos eles...se você tiver disposição para correr o risco, a vista do outro lado é espetacular.”

(Shonda Rhimes).

RESUMO

Introdução. A disfunção hepatocelular associada ao quadro de malária tem como principais alterações a insuficiência hepática, hepatoesplenomegalia e aumento das enzimas hepáticas. Diversos estudos já elucidaram que tais alterações hepáticas podem ser ocasionadas pelo aumento dos níveis amônia, que consequentemente pode levar à disfunção no sistema nervoso central (SNC), ocasionando um quadro de encefalopatia hepática, culminando em aumento da resposta inflamatória, edema cerebral, desregulação de neurotransmissores e alterações cognitivas e locomotoras. No entanto, pouco se sabe sobre o quadro da encefalopatia na malária não complicada, o que justifica os estudos voltados para elucidar tais mecanismos envolvidos nesse processo. **Objetivo.** Caracterizar as possíveis alterações no sistema nervoso central a partir de uma lesão hepática induzida pela infecção por *Plasmodium berghei* ANKA em modelo murino de malária não complicada. **Metodologia.** Para isso foram utilizados camundongos da linhagem Balb-c (20-25g) entre 45-54 dias pós-natal (CEUA nº 2229290317), inoculados com $\sim 10^6$ de eritrócitos parasitados via intraperitoneal. O delineamento experimental foi dividido em duas partes: Primeiramente foram caracterizadas a curva de sobrevivência, parasitemia, massa corpórea, sinais clínicos, alterações hepáticas e histológicas, neuroquímica, presença de edema cerebral, extravasamento vascular, resposta inflamatória, alterações comportamentais e quantificação dos níveis de amônia nos grupos controle e PbA. Posteriormente, foi realizado um tratamento com lactulose para verificar se as alterações encontradas nos experimentos anteriores eram em decorrência do aumento dos níveis de amônia no cérebro dos animais. Para isso os grupos foram divididos em: grupo controle, lactulose 3mg/kg, PbA e PbA+lactulose 3mg/kg, no qual foi avaliado a curva de sobrevivência, parasitemia e atividade locomotora pelo protocolo SHIRPA. Os resultados foram expressos como média+desvio padrão. Foi realizado o ANOVA (uma via), pós teste Tukey, considerando como significativo $p < 0,05$. **Resultados.** Os dados demonstraram que o grupo PbA apresentou alterações nas funções hepáticas como aumento dos níveis de AST e ALP, BT e BD, alterações morfológicas como a hepatoesplenomegalia, além das alterações histológicas evidenciar infiltrado inflamatório, deposição do pigmento malárico e hiperplasia das células de Kupffer, demonstrando dessa forma um quadro de falência hepática. Após caracterizar a lesão hepática, buscou-se entender se essas alterações poderiam gerar um comprometimento no SNC, o qual observamos um comprometimento cognitivo e motor, além de alterações nos níveis dos neurotransmissores GABA e glutamato, acompanhado com aumento da resposta inflamatória, edema cerebral e disfunção na barreira hematoencefálica. Uma vez demonstrado a falência hepática e, consequentemente, a presença de alterações cognitivas e comportamentais, buscou-se avaliar os níveis de amônia no cérebro dos animais controle e PbA na fase inicial da infecção. Nesse sentido, a quantificação dos níveis de amônia, evidenciou um aumento no 10º d.p.i., no tecido cerebral quando comparado com o grupo controle, em que os níveis estavam dentro do esperado em relação a atividade locomotora, ao realizar o protocolo SHIRPA no grupo infectado e tratado com lactulose, foi possível observar que o grupo PbA apresentou alterações no comportamento motor, quando comparado com o grupo controle. Em contrapartida, o grupo PbA+Lactulose 3mg/kg apresentou uma atenuação das alterações cognitivas e comportamentais, evidenciando que a terapia com

lactulose consegue atenuar o quadro cognitivo quanto ao comportamento motor, força e tônus muscular, reflexo e função sensorial. **Conclusão.** A falência hepática ocasiona um quadro de encefalopatia hepática em modelo murino de malária não complicada, o qual culmina para alterações no sistema nervoso central pelo aumento dos níveis de amônia no cérebro e ao realizar o sequestro da amônia com o auxílio do tratamento com lactulose na dose de 3mg/kg, esta consegue atenuar os danos neurológicos dos animais com malária não complicada, demonstrando que as alterações comportamentais são provenientes de um quadro de encefalopatia hepática, ocasionada pelo aumento dos níveis de amônia no córtex dos animais infectados.

Palavra-Chave: Malária não complicada, Fígado, Amônia e Sistema nervoso central.

ABSTRACT

Introduction. The main changes in hepatocellular dysfunction associated with malaria are liver failure, hepatosplenomegaly and increased liver enzymes. Several studies have already elucidated that such liver changes can be caused by increased ammonia levels, which can consequently lead to dysfunction in the central nervous system (CNS), causing hepatic encephalopathy, culminating in an increase in the inflammatory response, cerebral edema, deregulation of neurotransmitters and cognitive and locomotor changes. **Objective:** To characterize possible changes in the central nervous system resulting from liver injury induced by *Plasmodium berghei* ANKA infection in a murine model of uncomplicated malaria. **Methodology.** For this, mice of the Balb-c lineage (20-25g) were used between 45-54 postnatal days (CEUA nº 2229290317), inoculated with ~106 parasitized erythrocytes intraperitoneally. The experimental design was divided into two parts: Firstly, the survival curve, parasitemia, body mass, clinical signs, hepatic and histological changes, neurochemistry, presence of cerebral edema, vascular extravasation, inflammatory response, behavioral changes and quantification of blood levels were characterized. ammonia in the control and PbA groups. Subsequently, a treatment with lactulose was carried out to verify whether the changes found in the previous experiments were due to the increase in ammonia levels in the animals' brains. For this purpose, the groups were divided into: control group, lactulose 3mg/kg, PbA and PbA+lactulose 3mg/kg, in which the survival curve, parasitemia and locomotor activity were evaluated using the SHIRPA protocol. The results were expressed as mean+standard deviation. ANOVA (one way) was performed, post Tukey test, considering $p < 0.05$ as significant. **Results.** Our data demonstrated that the PbA group presented changes in liver functions such as increased levels of AST and ALP, BT and BD, morphological changes such as hepatosplenomegaly, in addition to histological changes showing inflammatory infiltrate, deposition of malarial pigment and Kupffer cell hyperplasia, thus demonstrating a picture of liver failure. After characterizing the liver injury, we sought to understand whether these changes could generate impairment in the CNS, which we observed cognitive and motor impairment, in addition to changes in the levels of the neurotransmitters GABA and glutamate, accompanied by an increase in the inflammatory response, cerebral edema and dysfunction in the liver. blood-brain barrier. Once liver failure was demonstrated and, consequently, the presence of cognitive and behavioral changes, we sought to evaluate ammonia levels in the brains of control and PbA animals in the initial phase of infection. In this sense, the quantification of ammonia levels showed an increase on the 10th d.p.i., in brain tissue when compared to the control group, in which the levels were within expectations in relation to locomotor activity, when applying the protocol in the infected and treated group with lactulose, it was possible to observe that the PbA group showed changes in motor behavior, when compared to the control group. In contrast, the PbA+Lactulose 3mg/kg group showed an attenuation of cognitive and behavioral changes, showing that therapy with lactulose can attenuate the cognitive condition regarding motor behavior, muscle strength and tone, reflexes, and sensory function. **Conclusion.** We conclude that liver failure causes hepatic encephalopathy in a murine model of uncomplicated malaria, which culminates in changes in the central nervous system, by increasing ammonia levels in the brain, and by sequestering ammonia with the help of treatment. with lactulose at a dose

of 3mg/kg, it can attenuate the neurological damage of animals with uncomplicated malaria, demonstrating that the behavioral changes come from a condition of hepatic encephalopathy, caused by increased levels of ammonia in the cortex of infected animals.

Keywords: Uncomplicated malaria, Liver, Ammonia and Central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de risco mostrando o percentual da população geográfica mundial susceptível a contrair malária. Fonte: WHO, 2022.....	22
Figura 2	Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil. Fonte: SINAN/SVS e SIVEP-Malária/SVS/MS, 2022.....	23
Figura 3	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no homem, evidenciando os estágios pré-eritrocítico do esporozoíto. (A) Entrada do esporozoíto nos tecidos da pele por meio da picada do mosquito, seguida pela passagem do parasita pela epiderme para chegar aos vasos sanguíneos; (B) esporozoíto no lúmen do sinusóide hepático; (C) Escape do esporozoíto das células endoteliais e de Kupffer; e (D) esporozoíto invadindo os hepatócitos e atravessando células vizinhas usando várias abordagens moleculares. Fonte: BHALLA, 2006.....	24
Figura 4	Transporte de amônia do fígado para o SNC. A amônia sai do fígado e chega ao SNC, passando pela barreira hematoencefálica e atinge os astrócitos, produzindo glutamina e liberando fatores pró-inflamatórios. Fonte: LIMÓN, 2021.....	30
Figura 5	Desenho esquemático de linha temporal, evidenciando o período de pré-infecção, inoculação da cepa PbA e análises dos camundongos da linhagem Balb dos grupos controles e PbA.....	37
Figura 6	Avaliação do curso temporal da infecção com a cepa PbA. (A) Curva de sobrevivência, apresentando dois grupos experimentais: Controle e PbA (n=15 animais). (B) Porcentagem de parasitemia do grupo PbA. (C) Percentual de massa corpórea demonstrando uma queda lenta e gradual conforme a evolução da parasitemia no grupo infectado com a cepa PbA (* p<0,001 vs PbA).....	47
Figura 7	Análise morfológica do Fígado e Baço. (A) Imagem representativa do fígado dos grupos controle e PbA, evidenciando a hepatomegalia no grupo PbA no 10 ^o d.p.i. (B) Teor de água no fígado dos grupos controle e PbA no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. (C) Imagem representativa do baço dos grupos controle e PbA, evidencia a esplenomegalia no grupo PbA no 10 ^o d.p.i. (D) Teor de água no baço dos grupos controle e PbA no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. Resultados apresentando dois grupos experimentais: Controle e PbA. n=8 (10 ^o d.p.i); n=5 (20 ^o d.p. Média±Erro Padrão; p<0.01.....	49
Figura 8	Representação Histológica do tecido hepático do grupo controle sem alteração tecidual (A-B); Grupo PbA 10 ^o d.p.i (C) e grupo PbA 20 ^o d.p.i (D), evidenciando a desorganização tecidual com a presença de infiltrados e pigmento malárico. Imagens de A-D são mostradas em aumento de 400x; H- Hepatócitos H, V- veia hepática, S- área	

	sinusoidal, # - Células inflamatórias, Seta- Células de Kupffer com pigmento malárico (hemozoína).....	51
Figura 9	Atividade das enzimas hepáticas em camundongos Balb-C controle e infectados com Cepa ANKA. Níveis da Aspartato Aminotransferase (A), Alanina aminotransferase (B), Bilirrubina Total (C), Bilirrubina Direta (D). As análises foram realizadas no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. Dados apresentados em Média±Erro Padrão; p<0.01.....	53
Figura 10	Análise do campo aberto dos grupos controle e PbA, no 10 ^o e 20 ^o d.p.i., (n=10). (A) Número de quadrantes cruzados, avaliado pela exploração do animal durante 5 min de teste, (B) frequência do comportamento Grooming e (C) frequência de rearing. Considerando p<0,01 PbA vs controle; Dados apresentados em Média±Erro Padrão.....	55
Figura 11	Comprometimento comportamental no 10 ^o e 20 ^o dia após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária. O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: Comportamento motor, força e tônus muscular, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando o protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação individual (n=8) e os dados estão expressos como média ± SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. *p<0.01 PbA vs Controle.....	57
Figura 12	As alterações histopatológicas do tecido cerebral do grupo controle 10 ^o dia (A), grupo controle 20 ^o dia (B), mostrando um parênquima normal; Grupo PbA 10 ^o d.p.i (C) e grupo PbA 20 ^o d.p.i (D), mostrando infiltração celular (seta) desorganização tecidual e vacuolização. Imagens de A-D são mostradas em aumento de 100x...	58
Figura 13	Avaliação do parênquima cerebral dos grupos controle e PbA, pela quantificação do teor de água no cérebro (A) e pelo ensaio de permeabilidade vascular (B). As análises foram realizadas no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão; p<0.01.....	60
Figura 14	Liberação de GABA e Glutamato no tecido cerebral de camundongos Balb-c controle e infectado pela cepa PbA no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. Dados expressos em Média±Desvio Padrão; n=8 no 10 ^o e n=5 no 20 ^o d.p.i; *p<0,01 vs PbA.....	62
Figura 15	Análise da imunomarcagem para Iba1 (vermelho) por microscopia de fluorescência em cortes cerebrais o grupo controle e PbA no 10 ^o e 20 ^o d.p.i (A) (lente objetiva 20x); Concentração de TNF-α no plasma (B) e cérebro de camundongos controle e infectados com a cepa PbA, no 10 ^o e 20 ^o d.p.i. (C). Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; p<0.01.....	64
	Quantificação dos níveis de amônia no cérebro dos animais	

Figura 16	infectados e controle no 10 ^o d.p.i. Dados expressos pela média dos grupos. * PbA vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; p<0.05.....	66
Figura 17	Efeito do tratamento com a lactulose na curva de Sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa ANKA. (A) Tratamento com lactulose aumenta a sobrevivência dos animais infectados (p<0,01 teste log rank). (B) Porcentagem de parasitemia dos grupos PbA e PbA+Lactulose 3mg/kg (ns: não significativo). Os resultados apresentados estão expressos em Média±Desvio padrão (n=8).....	69
Figura 18	Tratamento com lactulose, atenua o comprometimento comportamental no 10 ^o d.p.i, após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária. O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: (A) comportamento motor, (B) força e tônus muscular, (C) reflexo e função sensorial, (D) estado neuropsiquiátrico e (E) função autonômica utilizando o protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação individual. Apresentando 4 grupos experimentais: controle, lactulose 3mg/kg, PbA e PbA+Lactulose 3mg/kg (n=8) e os dados estão expressos como média ± SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. *p<0.01 Controle vs PbA vs PbA+Lactulose 3mg/kg 10 ^o d.p.i. ** Lactulose 3mg/kg vs PbA+Lactulose 10 ^o d.p.i; # PbA vs PbA+Lactulose 10 ^o d.p.i.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pontuações de classificação clínica do comportamento dos animais.....	32
Tabela 2	Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA.....	41
Tabela 3	Gradação Histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados com a cepa ANKA de <i>Plasmodium berghei</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

BD: Bilirrubina Direta

BHE: Barreira Hematoencefálica

BT: Bilirrubina Total

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

ATP: Adenosina trifosfato

CLAE: Cromatografia liquida de alta eficácia

CSP: Proteína circunsporozoíto

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

EDTA: Ácido diaminotetrácetico

EH: Encefalopatia hepática

ELISA: Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immuno Sobert Assay)

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HE: Hematoxilina Eosina

Hz: Hemozoína

I.P.: Intraperitoneal

PbA: Cepa ANKA de *Plasmodium Berghei*

PBS: Solução salina com tampão fosfato

MC: Malária Cerebral

PCR: Proteína C reativa

PDH: Piruvato desidrogenase

SARA: Síndrome da angústia respiratória

SNC: Sistema nervoso central

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	21
2.2	CICLO BIOLÓGICO E ASPECTOS CLÍNICOS.....	23
2.3	MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	25
2.4	MALÁRIA NÃO COMPLICADA E COMPROMETIMENTO HEPÁTICO.....	27
2.4.1	Encefalopatia hepática.....	28
2.5	MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALARIA.....	31
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	34
4	METODOLOGIA.....	36
4.1	INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	36
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
4.3	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA.....	38
4.3.1	Avaliação da formação de edema.....	38
4.3.2	Cortes Histológicos do Tecido Cerebral e Hepático.....	38
4.3.3	Coloração de Hematoxilina e Eosina.....	39
4.3.4	Imunofluorescência.....	39
4.4	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	40
4.5	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	40
4.5.1	Campo Aberto.....	40
4.5.2	SHIRPA.....	41
4.6	EXTRAVAMENTO VASCULAR.....	42
4.7	AVALIAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE).....	43
4.8	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINA TNF- α PELO MÉTODO DE ELISA.....	43
4.9	DOSAGEM DE AMÔNIA.....	44
4.10	TRATAMENTO COM A LACTULOSE.....	45
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45

5	RESULTADOS	46
5.1	AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	46
5.2	A INFECÇÃO POR <i>Plasmodium Berghei</i> ANKA INDUZ A FALÊNCIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA...	48
5.2.1	Avaliação da Hepatoesplenomegalia nos camundongos Balb-C inoculados com a cepa PbA	48
5.2.2	Alterações histopatológicas no fígado dos camundongos da linhagem Balb-C inoculados com a cepa PbA	50
5.2.3	Determinação bioquímica do perfil hepático	52
5.3	A INFECÇÃO POR <i>Plasmodium Berghei</i> ANKA INDUZ ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	54
5.3.1	Alterações comportamentais em modelo murino de malária não complicada	54
5.4	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TECIDO CEREBRAL EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	58
5.5	AVALIAÇÃO DO EDEMA E INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	59
5.6	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	61
5.7	CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α E ATIVAÇÃO DA MICROGLIA.	63
5.8	A LESÃO HEPÁTICA INDUZ O AUMENTO DOS NÍVEIS DE AMÔNIA NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM MALÁRIA NÃO COMPLICADA.....	65
5.9	A REMOÇÃO DA AMÔNIA AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA E ATENUA OS DANOS COMPORTAMENTAIS DOS ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA <i>Plasmodium Berghei</i> ANKA.....	67
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	81
8	REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

A malária ainda se apresenta como um grave problema de saúde pública, em decorrência do número de casos em todo o mundo. No ano de 2021, estima-se que cerca de 247 milhões de pessoas contraíram malária e 627 mil foram a óbito em decorrência da infecção (WHO, 2022). Sua transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada por uma ou mais espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, dentre os quais 5 espécies são capazes de infectar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. Knowlesi* (SCHINDLER et al., 2019).

Dentre as espécies infectantes, o *P. falciparum* é potencialmente letal, por induzir uma das formas mais graves da doença, a malária cerebral (MC), principal causa de morte em crianças abaixo de cinco anos na África (ASHLEY & PHYO, 2018; SATO, 2021). Contudo, nas Américas, o *P. vivax* apresenta maior incidência, com ampla distribuição geográfica, desencadeando quadro mais brando da doença (ROUGERON et al., 2022). A malária pode apresentar diversos sintomas que possuem características de progressão rápida, podendo evoluir para formas graves. O curso da doença está diretamente relacionado com as características intrínsecas ao vetor, parasita e hospedeiro, como fatores genéticos e imunológicos (MILNER, 2018; WHITE, 2018).

Dentre as complicações observadas durante o curso da malária, podemos destacar a disfunção hepatocelular, caracterizada pelo aumento dos níveis séricos das transaminases hepáticas e bilirrubina, alcançando níveis críticos que podem gerar um quadro de falência hepática (JAIN, KAUSHIK & KAUSHIK, 2016; ODEDRA et al., 2020). A hepatopatia ocasionada pela malária vem sendo associada a uma maior incidência de complicações como choque, síndrome da angústia respiratória (SARA), lesão renal aguda e lesões no sistema nervoso central (SNC), o qual ainda é pouco elucidada no quadro de malária sistêmica (MOORE, 2018). Desse modo, o presente trabalho propõe elucidar por quais mecanismos o quadro de hepatopatia pode gerar alterações no SNC a partir da infecção com *Plasmodium*.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária é uma das doenças mais antigas e os primeiros relatos foram descritos em textos religiosos, por médicos que relacionavam os repetidos episódios febris como punição divina (GRIFFING et al., 2015). Hipócrates, no século V a.C, foi o primeiro a descrever o quadro clínico associado à malária e descartar tais suposições sobre a doença (ROSSATI et al., 2016). Em meados de 1845, o médico francês Charles Alphonse Laveran descreveu os primeiros parasitas da malária em hemácias humana (COX, 2010).

Causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodidae e gênero *Plasmodium*, seu principal modo de transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, contudo, a doença pode ser transmitida por outras vias, que incluem a transfusão sanguínea, uso compartilhado de agulhas contaminadas ou congenitamente (TUTEJA, 2007; BECHTSI & WATERS, 2017).

Dados na literatura reportam que mais de 200 espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar diversos animais, como répteis, aves e alguns mamíferos (MILNER, 2018). No Brasil, as espécies predominantes são o *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, dando destaque para o número de casos ocasionados pelo *P. vivax*. As principais diferenças entre essas espécies estão relacionadas com a morfologia, aspectos imunológicos, distribuição geográfica, padrões de infecção e na resposta ao tratamento (NG et al., 2008; MULLER, 2015; GRIGG & SNOUNOU, 2017).

Atualmente a malária atinge cerca de 84 países, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, Sudeste Asiático e América Latina. Estima-se que cerca de 59 a cada 1000 habitantes correm risco de contrair a doença (Figura 1), e sua alta taxa de morbidade e mortalidade ainda é um fator preocupante, uma vez que cerca de 619 mil pessoas vão a óbito por ano (WHO, 2022).

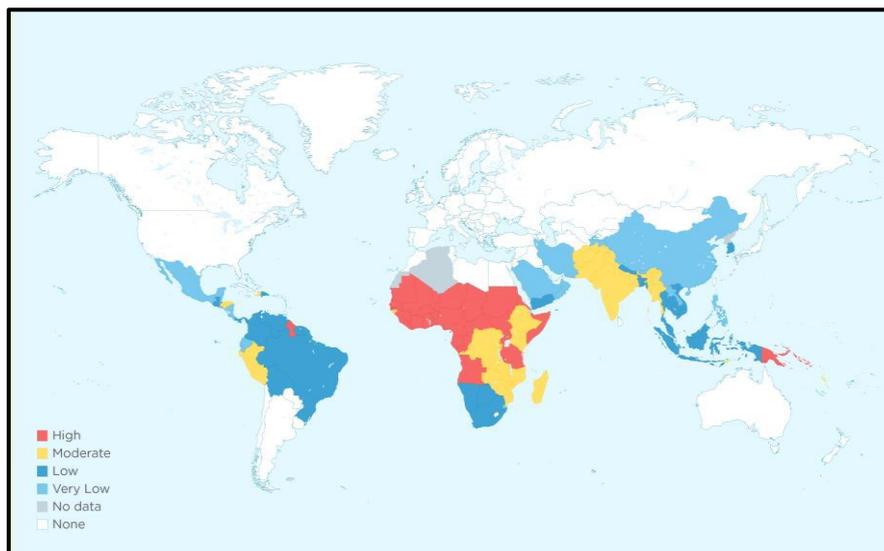


Figura 1: Mapa de risco mostrando o percentual da população geográfica mundial susceptível a contrair malária. Fonte: WHO, 2022.

No Brasil, cerca de 99% dos casos são observados na região Amazônica, incluindo os Estados do Amazonas, Acre, Roraima, Amapá, Mato Grosso, Tocantins, Maranhão e Pará, que apresentam uma incidência anual de 131 mil casos (Figura 2) (OMS, 2022).

A maior incidência, ocorre em decorrência de casos autóctones, ou seja, são provenientes do Brasil e estima-se que ainda no ano de 2022, foram registrados cerca de 108 mil casos da malária causado pelo *P. vivax* e cerca de 17 mil casos pelo *P. Falciparum*, além de 2 mil casos de infecções mistas, ocasionados por duas espécies de *plasmodium* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

No Pará, no ano de 2023 foram notificados 17.695 mil casos confirmados, principalmente nos municípios de Jacareacanga, Itaituba, Anajás, Breves, Altamira, Almeirim, Chaves, Afuá, Curalinho e Cumaru do Norte, juntos estes contribuem com aproximadamente 94,99% da malária no Estado do Pará (SESPA, 2023).

Segundo o Relatório Mundial da Saúde (2024), vem ocorrendo uma redução significativa nas taxas de mortalidade, bem como no número de casos de malária desde o ano 2000, contudo fatores como a resistência aos antimaláricos, desmatamento e o grande fluxo migratório da região Amazônica para outros estados brasileiros tem levado ao surgimento de surtos de malária em áreas consideradas livres de transmissão da doença.

A malária ainda representa um importante problema de saúde pública, acarretando graves complicações para o indivíduo, e tal fato justifica os estudos voltados para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da doença.

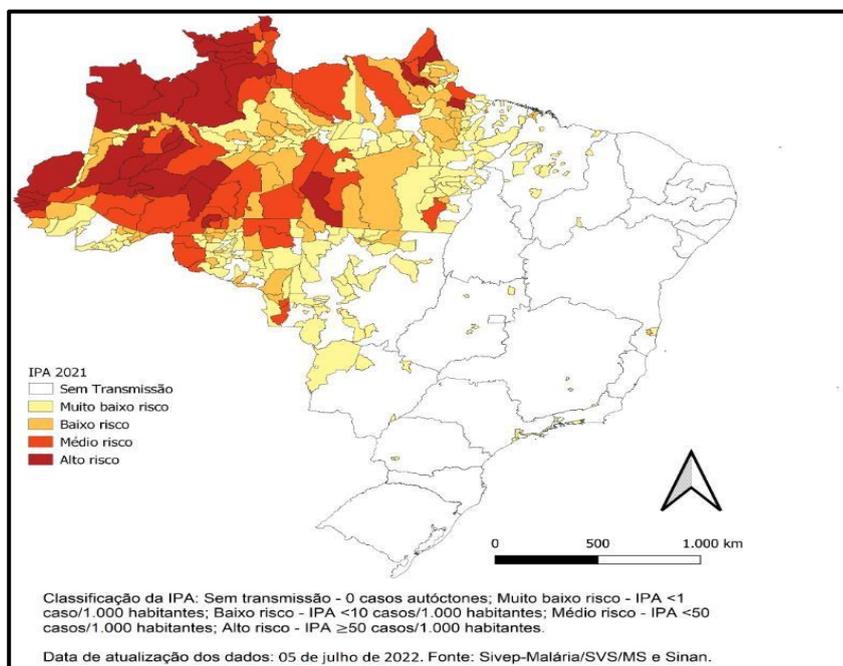


Figura 2: Mapa da prevalência e distribuição geográfica de casos clínicos da malária no Brasil. Fonte: SINAN/SVS e SIVEP-Malária/SVS/MS, 2022.

2.2 CICLO BIOLÓGICO E ASPECTOS CLÍNICOS

Um dos principais fatores associados ao agravamento da doença, como anemia e lesões hepáticas ocorrem devido ao ciclo biológico do parasita. O ciclo biológico do *Plasmodium* foi elucidado no final do século XIX e é altamente complexo, podendo ser dividido em duas fases: assexuada no hospedeiro vertebrado e sexuada no hospedeiro invertebrado (KORI, VALECHA & ANVIKAR, 2018) (FIGURA 3).

O ciclo se inicia com a picada do mosquito fêmea e a inoculação de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (VANDERBERG & FREVERT, 2004). Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram até o fígado pelas artérias hepáticas, atingindo os sinusoides, aderindo as células endoteliais e, posteriormente as células hepáticas (hepatócitos). A interação com as células hepáticas ocorre devido a capacidade dos esporozoítos em atravessar

a barreira celular, se ligando a uma proteína chamada de circunsporozoíto (CSP) que sinaliza ao parasita para migrar até o hepatócito e iniciar o ciclo hepático (TAVARES et al., 2013).

Nos hepatócitos, os esporozoítos permanecem por cerca de 2-16 dias, e durante esta fase, a infecção é assintomática (MOLINA-FRANKY et al., 2020). O decurso da infecção segue com a proliferação dos esporozoítos dando origem aos merozoítos. Cada esporozoíto é capaz de produzir cerca de 30.000 merozoítos, os quais rompem os hepatócitos e são liberados na corrente sanguínea, invadindo os eritrócitos e iniciando a fase eritrocítica do ciclo ou fase sintomática da doença (ABUGA, JONES-WARNER & HAFALLA, 2021). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos passam por três estágios: anel, trofozoíto e esquizonte (PRADEL & FREVERT, 2001).

Alguns merozoítos, por um mecanismo desconhecido, se diferenciam em gametócitos (forma infectante para o mosquito), os quais são ingeridos pelo mosquito *Anopheles*, após hematofagia (PRADEL & FREVERT, 2001). Os gametócitos migram para o estômago, onde formarão o zigoto. Este se transforma em oocineto, que migra para a parede do intestino do inseto formando o oocisto. O oocisto evolui a esporozoítos, que são liberados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares do mosquito, podendo reiniciar o ciclo. (BHALLA, SURI & SINGH, 2006; GARCIA, 2010; DAYANANDA, ACHUR & GOWDA, 2018).

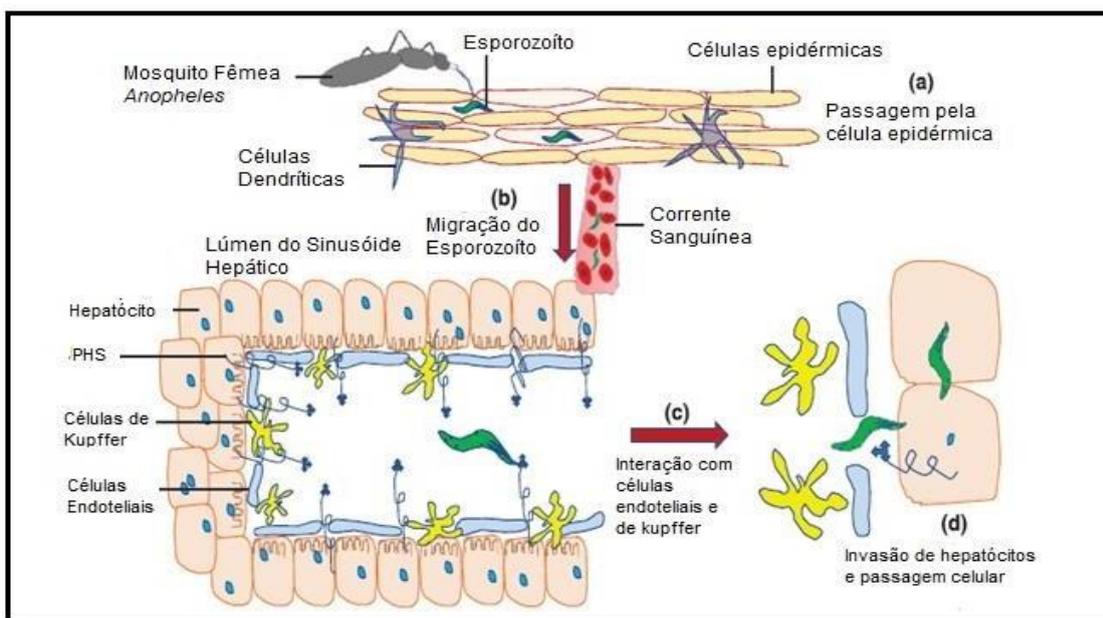


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* no homem, evidenciando os estágios pré-eritrocítico do esporozoíto. (A) Entrada do esporozoíto nos tecidos da pele por meio da picada do mosquito, seguida pela passagem do parasita pela epiderme para chegar aos vasos sanguíneos; (B) esporozoíto no lúmen do sinusóide hepático; (C) Escape do esporozoíto das células endoteliais e de Kupffer; e (D) esporozoíto invadindo os hepatócitos e atravessando células vizinhas usando várias abordagens moleculares. Fonte: BHALLA, 2006.

A infecção ocasionada pelo *Plasmodium* é resultado de uma interação complexa da biologia do parasito com uma resposta fisiopatológica do hospedeiro, ressaltando que a forma como o hospedeiro responde à infecção, dependerá da variabilidade genética, comorbidades e falhas no tratamento (MILNER, 2018).

Tal fato pode ocasionar uma evolução da doença com amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo uma infecção assintomática, malária não complicada e complicada. (SCACCABAROZZI et al, 2018).

Na fase inicial da doença, a sintomatologia é inespecífica, como mal-estar acompanhado de cefaleia, cansaço e mialgia, sendo geralmente precedidos de febre (MACE, LUCCHI & TAN, 2022). Em seguida, a febre assume um caráter intermitente, dependendo do tempo de duração do ciclo eritrocítico de cada espécie de *Plasmodium* (LONGLEY et al., 2015).

No que consiste as infecções assintomáticas, esta pode representar até 90% dos casos ocasionados pelo *P. Vivax*, e acredita-se que vários fatores possam estar envolvidos, como doenças pré-existente e ativação do sistema imune, fatores esses que vão determinar a progressão da doença. (TAYLOR et al., 2012).

2.3 MALÁRIA NÃO COMPLICADA

O quadro clínico da malária pode variar de leve, moderado e grave, o que depende da espécie infectante, período de incubação do parasita, sistema imunológico do hospedeiro e o tempo de infecção. Normalmente, quando descoberta em tempo hábil e tratada de forma adequada, o quadro clínico permanece estável, ou seja, não desenvolve graves complicações (BARTOLINI & ZAMMARCHI, 2012).

A fisiopatologia da malária não complicada envolve a presença de sinais e sintomas mais brandos, com a presença de febre, sudorese e dores de cabeça, podendo apresentar discretas alterações clínicas e laboratoriais. A evolução da malária não complicada ocorre de acordo com a espécie infectante, resposta imune do hospedeiro e uso correto dos antimaláricos (BABIKER, GADALLA & RANFORD-CARTWRIGHT, 2013; MILNER, 2018). Comumente, alguns pacientes podem evoluir para alterações ou disfunções hepáticas que frequentemente se estendem para outros órgãos (KAUFFMANN et al., 2021). À medida que doença progride, com o aumento da carga parasitária, estas complicações podem ser exacerbadas, podendo culminar em alterações no sistema nervoso central (MATLANI et al., 2020).

Como já descrito anteriormente, os sintomas da malária se iniciam após a ruptura dos eritrócitos, liberando os merozoítos na corrente sanguínea, com consequente aumento da carga parasitária, sendo este um dos principais fatores para o desenvolvimento dos sintomas. Marcadores como a proteína C reativa (PCR) e a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) podem aumentar na corrente sanguínea, e consequentemente, ativar uma cascata de eventos inflamatórios, desencadeando os sintomas no paciente (PELKONEN et al., 2015; ADDAI-MENSAH et al., 2019).

A malária não complicada é tratada durante seu ciclo sintomático com antimaláricos específicos para cada espécie de *Plasmodium*. Dessa forma o tratamento adequado se faz necessário para o controle da doença, assegurando que o indivíduo apresente uma melhora clínica de forma rápida e eficaz, evitando assim a progressão da doença para as formas graves. Contudo, vários fatores como a não adesão ao tratamento, interrupção e resistências aos antimaláricos tem contribuído para evolução de quadros graves como a encefalopatia hepática (MILNER, 2018).

Dados na literatura sugerem que pacientes acometidos por algumas espécies de *Plasmodium* podem apresentar um comprometimento neurológico e que esta complicação ocorre de forma gradual. O principal *Plasmodium* que comumente ocasiona danos neurológicos é o *P. falciparum* que desenvolve um quadro clássico da malária cerebral, entretanto, o *P. vivax* vem sendo associado ao desenvolvimento de convulsão e alterações cognitivas como a perda de memória em crianças (TRIVEDI & CHAKRAVARTY, 2022).

O envolvimento do sistema nervoso na malária não complicada pode estar associado como parte da síndrome neurológica pós-malária, visto que estudos em pacientes demonstram que sinais como ataxia cerebelar tardia também foram observados após a recuperação da malária clínica (CHAKRAVARTY et al, 2004).

Estudos acerca do envolvimento do sistema nervoso durante o desenvolvimento do quadro de malária não complicada ainda são escassos, bem como por qual mecanismo essas alterações no SNC se estabelecem, dessa forma, uma das principais vias que poderia levar a esse comprometimento seria um quadro de encefalopatia hepática.

2.4 MALÁRIA NÃO COMPLICADA E COMPROMETIMENTO HEPÁTICO

Como já descrito anteriormente, o fígado participa de forma ativa no ciclo evolutivo do parasito. Dessa forma, é comum observar o quadro de disfunção hepatocelular, que se caracteriza como uma patologia heterogênea, que pode variar desde alterações nos testes de função hepática até uma insuficiência hepática grave (KAUFFMANN et al., 2021).

O fígado é formado pelo parênquima lobular, sendo este constituído pelas seguintes células: hepatócitos, Kupffer e Ito, bem como pelos capilares sinusóides, perissinusoidais e pelos ductos biliares e sua fisiologia compreende importantes funções no organismo que vão desde a metabolização de nutrientes até a eliminação de compostos tóxicos ao organismo (CROSSINGHAM et al., 2009).

Um dos principais achados no decorrer da infecção é a hiperplasia das células de Kupffer, juntamente com a deposição do pigmento malárico conhecido como Hemozoína (Hz) (DEROOST et al., 2014). A Hz é formada a partir da degradação da hemoglobina pelo parasita, mais especificamente na fase intra-eritrocítica do ciclo (WHITTEN et al., 2011). A hemoglobina é uma metaloproteína e possui quatro grupos heme, após a digestão da hemoglobina o grupo heme é liberado na circulação, o qual é altamente tóxico tanto para o hospedeiro quanto para o parasito, que na tentativa de remover o grupo heme livre, promove a formação do pigmento malárico ou Hz (DEROOST et al., 2014).

No que diz respeito as enzimas hepáticas, sabe-se que os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são

considerados biomarcadores de lesão hepática, uma vez que a destruição das células hepáticas libera estas enzimas para a circulação. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente nas mitocôndrias (KIM et al., 2020).

Em várias patologias que acometem o fígado, essas transaminases têm aparecido com níveis elevados, principalmente, nos casos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hepatite viral e outras patologias como infecções parasitárias (BANFI et al., 2012; TIMOUMI et al., 2019).

Estudos já demonstram que os danos ocasionados no fígado, como a hepatomegalia, esplenomegalia, aumento das transaminases e fibrose podem levar a diversas complicações no indivíduo, incluindo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e quadro mais graves como a encefalopatia hepática (EH) (CERIOTTI et al., 2010).

Além destas complicações citadas anteriormente, lesões hepáticas quando não tratada de forma adequada ou tratadas de forma tardia, podem culminar em uma encefalopatia hepática, no qual além do comprometimento hepático a infecção ocasiona danos no sistema nervoso central podendo levar o indivíduo à óbito. Dessa forma, compreender os mecanismos que podem levar um indivíduo com malária a desenvolver a encefalopatia hepática, se faz necessário para tentar prevenir ou atenuar os possíveis danos neurológicos.

2.4.1 Encefalopatia hepática

A encefalopatia hepática (EH) é uma desordem neurológica, caracterizada por alterações motoras e cognitivas, que geralmente culminam em coma e, posteriormente óbito. Normalmente, está associada a doença hepática grave, podendo se manifestar de forma aguda, com manifestações clínicas graves, como o edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e hérnia cerebral, ou crônica cuja a sintomatologia pode variar desde sintomas neuropsiquiátricos como perturbações de sono, alterações no tônus musculares e déficits cognitivos até o coma (JAYAKUMAR & NORENBURG, 2018).

Seu mecanismo fisiopatológico é complexo e envolve diversas vias como inflamação, estresse oxidativo, alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, alterações no metabolismo energético e aumento dos níveis de

amônia, que juntos levam a uma alteração central astrocitária e neuronal (HIGARZA et al., 2019; BUTTERWORTH, 2019).

Diversos estudos apontam que o aumento da amônia é um dos principais fatores para o desencadeamento dos sintomas clínicos da EH, que inclui cefaleia, confusão mental, convulsão e coma. Nesse contexto, acredita-se que a amônia não é eliminada corretamente pelo fígado, caindo na circulação sistêmica e atingindo o cérebro, gerando os efeitos deletérios neste sistema (JAYAKUMAR & NORENBORG, 2018; LU et al., 2019; NAKADATE & KAMATA, 2022).

A produção da amônia ocorre como um produto resultante do catabolismo, das proteínas, purinas e pirimidinas. Geralmente sua metabolização acontece nos hepatócitos periportais no qual será convertida em ureia por uma série de reações bioquímicas (DASARATHY et al., 2017). Além desse sistema, outra forma de eliminar a amônia no sistema nervoso, ocorre pelo ciclo glutamina/glutamato, o qual acontece no terminal pré-sináptico por uma reação de desaminação oxidativa, sendo catalisada pela ação da enzima glutamato desidrogenase que converte amônia e glutamato em glutamina (DASARATHY et al., 2017).

A amônia se apresenta como uma neurotoxina e tem sido muito estudada durante o desenvolvimento da encefalopatia hepática, sendo que seu mecanismo neurotóxico ainda é pouco compreendido. Com o aumento dos seus níveis no sistema nervoso central, ocorre alterações no metabolismo energético cerebral, que conseqüentemente culmina com o estresse oxidativo, além da disfunção em sistemas de neurotransmissores como o GABAérgico e glutamatérgico (BUTTERWORTH, 2018).

Estudos sugerem que as alterações no metabolismo energético possam acontecer pela inibição das enzimas piruvato desidrogenase (PDH) e α -cetoglutarato desidrogenase, ocasionando uma diminuição de adenosina trifosfato (ATP), uma vez que há alterações no ciclo de Krebs, e conseqüentemente, um aumento da glicólise na tentativa de compensar o sistema (HERTZ & KALA, 2007).

À medida que a encefalopatia progride é possível observar uma série de alterações comportamentais que vão desde mudanças no estado de humor, ataxia, perda de equilíbrio até o coma. Tais alterações ocorrem devido a quadro de astrogliose que é muito comum durante o curso da encefalopatia, além da ativação da micróglia que ocasiona um aumento de citocinas pró inflamatórias na

tentativa sinalizar que o sistema nervoso está sendo comprometido (BUTTERWORTH, 2018).

No quadro de malária pouco se sabe a respeito da encefalopatia hepática durante a progressão da doença, contudo, infecções por *Echinococcus* spp e hepatite C provocam alterações hepáticas importantes como a fibrose, alterações celulares e exacerbação da resposta inflamatória, culminando em lesão hepática e conseqüentemente a encefalopatia (NIU et al., 2019; FORTINI et al., 2019).

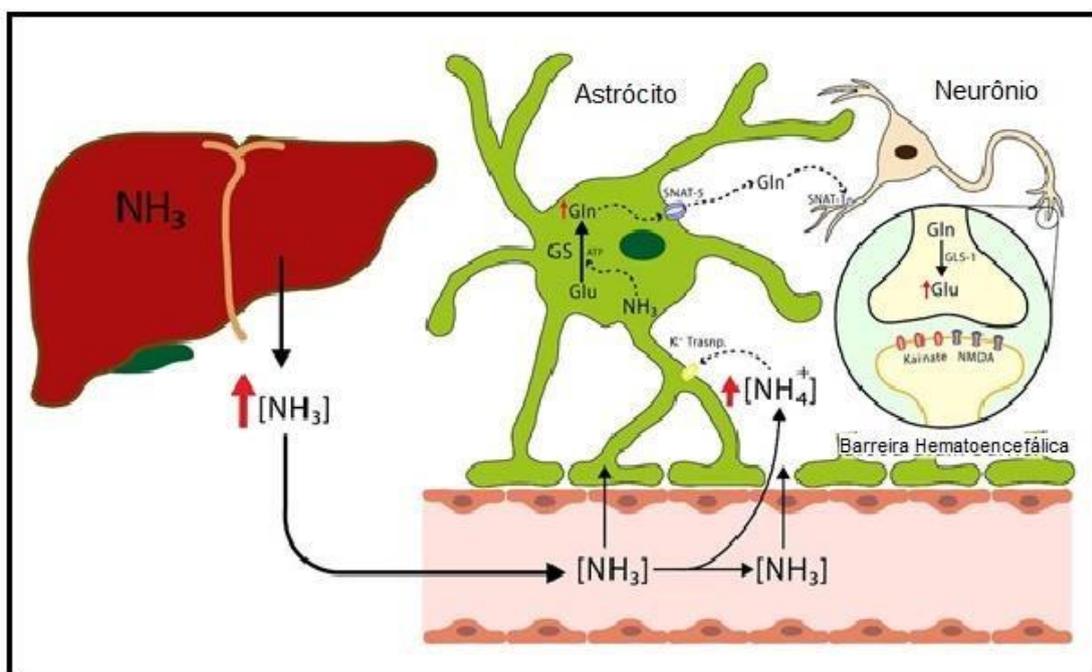


Figura 4: Transporte de amônia do fígado para o SNC. A amônia sai do fígado e chega ao SNC, passando pela barreira hematoencefálica e atinge os astrócitos, produzindo glutamina e liberando fatores pró-inflamatórios. Fonte: LIMÓN, 2021.

A encefalopatia hepática representa uma complicação grave, impactando diretamente na qualidade de vida do paciente. O tratamento visa reduzir os níveis de amônia, melhorando assim os sinais e sintomas e, atualmente diversas opções de tratamento têm se mostrado promissoras na melhora do quadro de EH, e dentre as opções destaca-se o uso de antibióticos como a rifaxim 500mg, aminoácidos como L-ornitina e L-aspartato, e dissacarídeos não absorvíveis como a lactulose (HUDSON & SCHUCHMANN, 2019).

A lactulose é um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e frutose, e se apresenta como um dos medicamentos mais utilizados como

primeira escolha para o tratamento de EH. Uma vez ingerida, a lactulose não é absorvida pelo trato gastrointestinal e tem a capacidade de passar pelo intestino delgado e grosso sem sofrer alteração, o qual vai ser fermentada pelas bactérias sacarolíticas, produzindo ácido lático e ácido acético (AIDER & GIMENEZVIDAL, 2022).

Esse processo de acidificação faz com que as bactérias intestinais não produzam amônia, e ajudam a reduzir os níveis de amônia no sangue, formando o íon amônio (NH_4^+), que será eliminado nas fezes. Um outro benefício da lactulose é que esse dissacarídeo tem um efeito laxante, aumentando a taxa de evacuação, que remove o nitrogênio intestinal que produz excesso de amônia no corpo (PANESAR & KUMARI, 2011; AIDER & GIMENEZVIDAL, 2022).

A dose da lactulose depende da condição clínica e estado do paciente, podendo chegar até 667mg/kg, em que normalmente é administrada com volumes entre 25ml e 80ml ao dia por via oral. Diversos estudos demonstram grande eficácia como profilaxia no desenvolvimento de EH em pacientes com cirrose, reduzindo significativamente os níveis de amônia e melhora da função cognitiva (LIU et al., 2018).

No que diz respeito a malária, o papel da amônia ainda é pouco elucidado, e alguns estudos sugerem que essa neurotoxina pode exacerbar o quadro clínico do hospedeiro (DENNIS et al., 2014; RACKAYOVA et al., 2020). Dessa forma, o presente estudo se propõe a investigar qual a relação da falência hepática com as alterações no SNC, bem como traçar novas estratégias terapêuticas na tentativa de atenuar as complicações neurológicas associadas a malária não-complicada.

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS EM MALÁRIA

A utilização de modelos experimentais surge como uma importante ferramenta para elucidar as alterações neurológicas associadas ao quadro de malária não complicada, elucidando a via pelo qual essas alterações podem se estabelecer (WHITTEN et al, 2012).

Modelos experimentais utilizando roedores já estão bem caracterizados e estabelecidos na literatura, sendo de extrema importância para a pesquisa científica (TRITTEN et al., 2014; DEGHAN et al., 2018). O modelo murino possibilita investigar mecanismos fisiopatológicos associados a diversas doenças,

inclusive a malária, uma vez que existem algumas similaridades entre a resposta a medicamentos e características patológicas da infecção em humanos e camundongos (LAMB et al., 2006).

A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* tem contribuído para elucidar alguns aspectos envolvidos na patogênese da doença. Nesse sentido, estudos vem utilizando o *Plasmodium berghei* ANKA, que é uma espécie infectante para roedores (DE SOUZA & RILEY, 2002).

A maioria dos estudos em modelo murino de infecção por *P. berghei* ANKA, utiliza duas linhagens de camundongos, a linhagem resistente ao desenvolvimento do quadro de MC, como o BALB/c que se enquadra como um bom modelo de estudo de malária não-complicada e linhagens susceptíveis ao desenvolvimento da malária grave: C57BL/6, CBA e Albino Suíço, que desenvolvem o quadro de MC (RECUENCO et al., 2014).

Estudos vêm demonstrando que camundongos Balb-C infectados com a cepa ANKA podem apresentar quadros clínicos de síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) com acidose láctica, anemia e nefrite, indicando que estes podem desenvolver manifestações clínicas semelhantes à malária por *P. vivax* (VAN DER HEYDE et al., 2001). Estas linhagens também são capazes de apresentar sinais neurológicos como coma, paralisia e convulsão (Tabela 1) (MEDANA et al., 1997).

Tabela 1: Pontuações de classificação clínica do comportamento dos animais:

Grau Clínico	Definição
0	Comportamento normal
1	Letargia Leve
2	Atividade motora e percepção de dor diminuída
3	Ataxia, nenhum reflexo de endireitamento espontâneo
4	Nenhum reflexo de endireitamento, nenhuma reação ao reflexo da dor

Importante ressaltar que modelos murinos são eficazes na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da malária e na encefalopatia hepática e dados na literatura apontam o uso desse modelo na avaliação das alterações metabólicas induzidas por parasitas bem como avaliação neurológica ocasionada a partir de danos hepáticos.

Além disso, os modelos experimentais são de suma importância para avaliar as alterações neurocomportamentais que podem estar presente durante a infecção por *Plasmodium*, como demonstrado em estudos prévios (OLIVEIRA et al., 2022; JANE et al., 2023). As principais alterações observadas durante a infecção são ataxia, alterações motoras, diminuição do comportamento de higiene, convulsão e danos cognitivos relacionado a memória (ROSA-GONÇALVES et al., 2022; MOHANTY et al, 2021).

Dentro deste contexto, no presente estudo a utilização de modelos experimentais de malária não complicada, a partir da infecção de camundongos Balb-C com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA, apresenta-se como uma valiosa ferramenta para elucidar as vias pelo qual o modelo desenvolve o comprometimento neurológico e quais os mecanismos estão associados ao quadro de encefalopatia hepática, permitindo testar novas terapias com objetivo de atenuar tais danos neurológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as alterações no sistema nervoso central a partir da lesão hepática induzida pela infecção por *Plasmodium berghei* ANKA em modelo murino de malária não complicada.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Caracterizar o quadro da malária não complicada a partir da determinação da curva de sobrevivência, massa corpórea e níveis de parasitemia em camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA);
- Determinar as alterações morfológicas e bioquímica do fígado pela formação da hepatoesplenomegalia, histologia do tecido hepático e dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas total e direta, no plasma de camundongos Balb-C inoculados com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.
- Caracterizar as alterações neurocomportamentais em camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.
- Avaliar as alterações histológicas no cérebro dos camundongos Balb-C após a inoculação com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.
- Determinar a formação de edema e de extravasamento vascular no cérebro dos camundongos Balb-C após a inoculação com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.
- Determinar os níveis dos neurotransmissores glutamato e GABA no cérebro dos camundongos Balb-c após inoculação com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.
- Avaliar a resposta inflamatória com a marcação de microglia no tecido cerebral e dosagens dos níveis de TNF- α no cérebro e plasma de

camundongos após a inoculação com a cepa PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção.

- Quantificar os níveis de amônia no cérebro dos camundongos Balb-c após inoculação com a cepa PbA no 10^o dia pós infecção.
- Avaliar o efeito do tratamento com lactulose na dose 3mg/kg, no quadro de malária não complicada pela determinação da curva de sobrevivência, níveis de parasitemia e alterações comportamentais.

4. METODOLOGIA

4.1 INDUÇÃO DO QUADRO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Neste estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Balb-C (fêmeas e machos), com idade entre 6-8 semanas pós-natal, pesando aproximadamente 20-25 gramas, adquiridos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, contendo no máximo 5 camundongos por gaiola, mantidos em condições assépticas, com água e comida (NUVITAL) *ad libitum* e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) controlada.

Para indução da malária experimental foi utilizado a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), obtida no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (ICB/UFPA). Inicialmente, uma alíquota de sangue foi descongelada e inoculada em um camundongo Balb-C por injeção intraperitoneal (i.p). Ao atingir entre 5-10% de parasitemia, o sangue foi coletado por punção cardíaca com o auxílio 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 a inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram inoculados via i.p com inóculo de 10⁶ eritrócitos parasitados diluído em 100µl de PBS. A quantificação dos eritrócitos parasitados foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer de acordo com o número total de eritrócitos em suspensão pela porcentagem de parasitemia (KAUFFMANN et al., 2021).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram divididos em grupos controle (n=10) e PbA (n= 10). Após a infecção os animais foram submetidos as análises e teste conforme mostra a linha temporal abaixo:

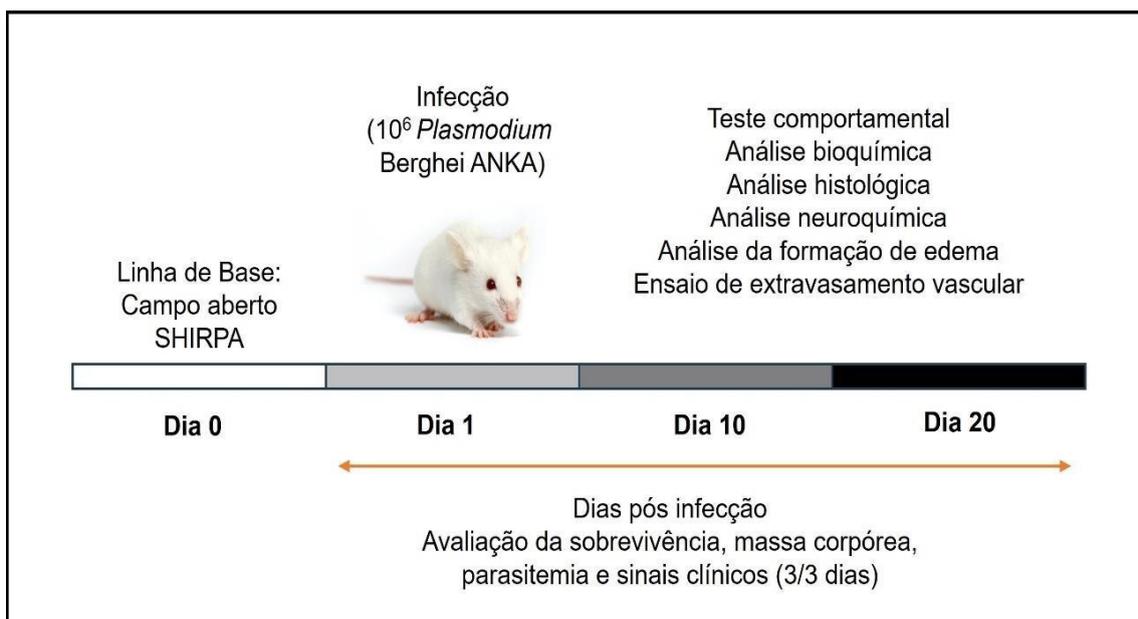


Figura 5: Linha temporal evidenciando o período de pré-infecção, inoculação com a cepa PbA e análises dos camundongos da linhagem Balb dos grupos controle e PbA.

A progressão da infecção foi avaliada pelo acompanhamento da sobrevivência, variação da massa corpórea, evolução da parasitemia e a presença de sinais clínicos dos camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* nos diferentes dias pós-infecção (KAUFFMANN et al., 2022).

A curva de sobrevivência foi obtida a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito em seus respectivos dias pós-infecção (d.p.i). Para o monitoramento da massa corpórea, os camundongos foram pesados antes da infecção, com a finalidade de determinar sua massa corpórea e após serem infectados com a cepa PbA, passaram a ser pesados de 3/3 dias com o auxílio de uma balança analítica.

A determinação da parasitemia foi realizada por meio de distensões sanguíneas delgadas em lâminas histológicas a partir da obtenção de uma gota de sangue da veia da cauda do animal. Após o período de secagem das lâminas, estas foram fixadas com metanol absoluto (P.A) durante 2 minutos e, posteriormente, coradas pelo método de Giemsa (10%) por 15 minutos. A porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células (1000 células por campo). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000x maximização final), e as contagens das células foram realizadas com auxílio do programa ImageJ, o que garante uma

maior precisão na porcentagem de parasitemia de cada animal. A determinação da parasitemia foi realizada de 3 em 3 dias, até que o animal evoluísse a óbito.

4.3 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA

4.3.1 Avaliação da formação de edema

As alterações morfológicas foram realizadas de acordo com o método úmido/seco, no qual foi realizado quantificação do teor de água no cérebro, fígado e baço como marcador de edema cerebral e hepatoesplenomegalia, o qual foram determinados conforme descrito anteriormente por Ding et al. (2015).

A formação de edema foi avaliada no 10^o e 20^o dia pós infecção, com a finalidade de avaliar o período inicial e tardio da infecção. Os camundongos foram anestesiados e, posteriormente, foi realizado a craniotomia, hepatectomia e esplenectomia para a coleta dos respectivos órgãos. Em seguida, os órgãos foram pesados para determinação do peso úmido, e posteriormente submetidos a uma secagem em estufa na temperatura de 80°C por 72 h (peso seco). A porcentagem de teor de água foi estimada pela fórmula $[(\text{peso úmido} - \text{peso seco})/\text{peso úmido} \times 100\%]$.

4.3.2 Cortes Histológicos do Tecido Cerebral e Hepático

As alterações histopatológicas foram realizados com cortes histológicos do tecido cerebral e hepático de camundongos Balb-C controle e infectado com PbA no 10^o e 20^o dia pós infecção, conforme descrito por Viriyavejakul, Khachonsaksumet & Punsawad (2014).

Inicialmente, os animais foram anestesiados e o cérebro coletado por craniotomia e o fígado por hepatectomia. As amostras foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas. Em seguida, armazenados em gaze e, progressivamente, desidratados em soluções com gradiente de concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) durante 20 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol (PA), duas vezes, durante 10 minutos e parafinizadas (58-60°C) por 40 minutos (2x), formando blocos de parafina. Os blocos foram cortados com auxílio de micrótomo em uma

espessura de 5µm, seguido da montagem das lâminas histológicas. Em seguida, foi realizado a desparafinização durante 24 horas em estufa de secagem a 56°C.

4.3.3 Coloração de Hematoxilina e Eosina

O estudo histopatológico do tecido cerebral e hepático, foram avaliados utilizando a técnica de coloração por hematoxilina e eosina (HE), de acordo com o método proposto por Mu et al., (2018). Os cortes histológicos foram inicialmente diafanizados em xilol por 30 segundos, seguido de banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 30 segundos. Após isso, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas em água destilada corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por 30 segundos e então lavadas, novamente, em água destilada corrente por mais 5 minutos. Após esse último passo, as lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific. New Jersey, USA).

Para análise dos cortes foi utilizado um microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada.

4.3.4 Imunofluorescência

A avaliação da técnica de imunofluorescência foi utilizada o protocolo adaptado de Zhao et al (2019). Os cortes histológicos foram diafanizados em xilol por 30 segundos, seguido de banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 30 segundos. As secções obtidas do tecido cerebral foram, primeiramente, lavadas 3 vezes com PBS durante 10 minutos. Em seguida, houve a incubação dos cortes com uma solução de bloqueio constituída de 0,5% de Triton X-100; 1% de BSA; 10% de soro de coelho durante 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, as secções foram incubadas com anticorpo primário (IBA 1:400 em solução de bloqueio) à temperatura de 4°C por 12-18 horas. Em seguida, após sucessivas lavagens, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário específico conjugado ao fluorocromo Alexa Flúor 488, (1:200 em solução de bloqueio) durante 1 hora à temperatura ambiente. Para análise dos cortes, foi realizado a montagem das lâminas com Fluoroshield e, posteriormente, visualizado sob microscopia de fluorescência com auxílio da

objetiva de 20x (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada. Os dados foram analisados no software ImageJ.

4.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Para avaliação da funcionalidade do fígado foi realizado a análise do soro dos animais controle e infectado no 10^o e 20^o dia de infecção. Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (i.p.) e sacrificados, sendo feita a coleta do sangue por punção cardíaca. Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, realizado a quantificação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total e bilirrubina direta. Os ensaios bioquímicos foram realizados de acordo com as instruções do kit comercial e determinados em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 340 nm.

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.5.1 Campo Aberto

Para a realização do teste em campo aberto foi utilizado aparato, confeccionado em madeira e revestido internamente com lona preta, tendo como característica uma arena circular de 83 cm de diâmetro e 52 cm de altura, o teste foi realizado de acordo com o método de Desruisseaux et al (2008).

Este teste é utilizado para avaliar a atividade locomotora em roedores. Inicialmente foi realizado o teste linha de base, feito nos animais antes da infecção, com a finalidade de avaliar previamente os parâmetros comportamentais como atividade locomotora, freezing, grooming, elevação das patas, avaliação do tempo no centro e borda do aparato. No 10^o e 20^o dia pós-infecção, os animais foram colocados novamente no centro aparato, individualmente, para efetuar a exploração durante 5 minutos, cada sessão foi devidamente gravada com auxílio do programa Debut Vídeo Capture Software versão 1.49 e posteriormente, analisada por meio do software Mouse Track versão 2.25.

4.5.2 SHIRPA

O protocolo SHIRPA (“SmithKline Becham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary’s; Royal London Hospital, St Bartholomew’s and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment”), foi utilizado com a finalidade de avaliar as alterações comportamentais e neurológicas durante a evolução da infecção com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*. Os critérios de avaliação deste protocolo foram baseados nos estudos de Martins et al., 2010.

Os parâmetros avaliados foram classificados em 5 categorias funcionais, as quais podem ser observadas na tabela 2 e, em cada categoria, foram avaliados diversos parâmetros com scores independentes que variaram de 0-5 onde 0 indicava prejuízo de uma determinada função e 5 sem comprometimento.

A bateria de testes foi realizada antes da infecção pela cepa ANKA de *Plasmodium berghei* para registrar que os animais não apresentavam nenhuma alteração ou comprometimento prévio, e nos dias 10 e 20º pós infecção, a fim de se verificar se os animais apresentavam alguma alteração em função da doença. Ressalta-se que o protocolo foi realizado com auxílio de equipamentos como aparato do campo aberto, pinça, cabide, grade e becker para análises dos parâmetros deste protocolo. Cada sessão foi devidamente gravada por 5 minutos com auxílio do programa Debut Vídeo Capture Software versão 1.49 e posteriormente, analisada por meio do software Mouse Track versão 2.25.

Tabela 2: Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA.

Domínios Funcionais	Parâmetros Avaliados
Comportamento Motor	Posição corporal, Elevação pélvica, Elevação da cauda, Marcha, Encurvamento do tronco, Tremor, Geotaxis negativa, Manobra do arame (“Wire manoeuvre”).

Tônus Muscular e Força	Força ao agarrar, Tônus abdominal, Tônus corporal, Tônus dos membros.
Reflexo e Função Sensorial	Posicionamento visual, Reflexo auricular (“Pinna reflex”), Reflexo corneal, Reflexo de endireitamento, Beslicada dos dedos da pata traseira (“Toe pinch”).
Aspectos Neuropsiquiátricos	Excitação de transferência, Passividade posicional, Atividade espontânea, Escape ao toque, Mordida, Medo, Irritabilidade, Agressão e Vocalização.
Função Autonômica	Taxa de respiração, Piloereção, Frequência cardíaca, Lacrimejamento, Salivação, Fechamento das pálpebras, Micção e Defecação.

4.6 EXTRAVAMENTO VASCULAR

O ensaio de permeabilidade vascular foi realizado com o intuito de avaliar a integridade da barreira hematoencefálica no tecido cerebral de camundongos da linhagem Balb-C inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA), utilizando o corante Azul de Evans como marcador de extravasamento vascular. Essa técnica foi adaptada do método descrito por SCHMIDT *et al.*, 2011.

No 10^o e 20^o dia pós infecção, após a realização de todos os experimentos comportamentais, os camundongos dos grupos controle e infectado foram anestesiados com quetamina e xilazina via i.p, seguido da injeção de corante Azul de Evans a 2% (200 µl) no coração de cada animal. Após o bombeamento do corante para o corpo do animal, este foi perfundido com 10ml de Solução Salina (0,9%) e o cérebro coletado por craniotomia. Os cérebros foram pesados e,

posteriormente, foi adicionado uma solução de formamida por 48 h a 37°C (no escuro) para extrair o corante azul de Evans do tecido cerebral. A concentração do corante Azul de Evans foi medida em leitor de microplaca no comprimento de onda de 620 nm e calculada usando uma curva padrão do corante. Os dados foram expressos como microgramas de corante extravasado por grama de tecido cerebral.

4.7 AVALIAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE)

A técnica de cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE), foi utilizada para dosagem dos neurotransmissores glutamato e GABA, o qual permite a separação e análise de componentes químicos em amostras biológicas. O sistema utilizado apresenta circuito de injeção de 20µL e detector fluorescente RF-10AXL acoplado a uma bomba LC-20AT. Para medida dos neurotransmissores foi utilizado o método previamente descrito por Moraes et al (2012). Os animais foram anestesiados e o tecido cerebral foi coletado por craniotomia no 10º e 20º dia pós-infecção. Após a coleta os cérebros dos animais do grupo controle e infectado, os mesmos foram acondicionados em placa de cultura, seguindo de lavagem do tecido cerebral com solução Hank em baixa temperatura. Após o ensaio de liberação, as amostras foram coletadas e injetadas no sistema CLAE. Para correção dos dados obtidos foi realizada a dosagem de proteína de acordo com método descrito por Bradford (1976).

4.8 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINA TNF- α

A determinação dos níveis TNF- α no tecido cerebral e plasma foram quantificados pelo método de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay) com a utilização de kit específico. Para obtenção do tecido, os animais foram anestesiados, seguido da coleta do sangue para obtenção do plasma e o tecido cerebral dissecado por craniotomia, o qual foi transferido para tubos falcons e acrescido 600µl 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). Em seguida, as amostras foram sonicadas em homogeneizador de tecidos e

centrifugadas a 5000 rpm a 4°C durante 10 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 de acordo com o método descrito acima. Para o ensaio de dosagem de TNF- α 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 solução de PBS (0,05% Tween-20) e incubada com a solução de bloqueio por mais uma hora, em agitação. Em seguida, após três lavagens, as amostras foram adicionadas à 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 , a uma concentração inicial de 500pg/ml.

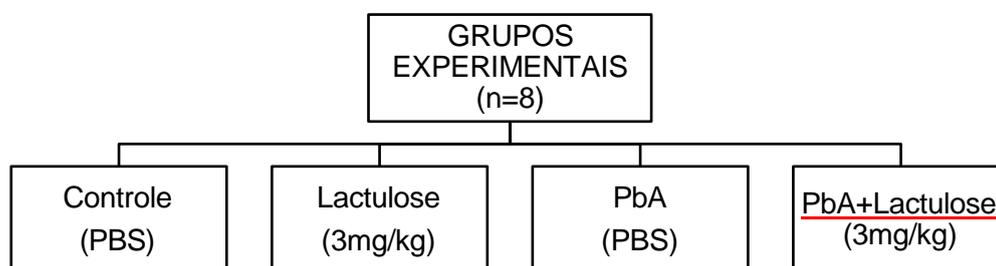
Após a incubação das amostras e da curva-padrão, uma solução do anticorpo de detecção foi adicionada por mais uma hora, seguida da solução de avidina ligada a peroxidase (HRP). Após a adição do substrato TMB, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2N). A quantidade de TNF- α em cada poço foi determinada, 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. A determinação da resposta inflamatória no tecido cerebral e plasma dos grupos controle e infectado foi realizado no 10^o e 20^o d.p.i.

4.9 DOSAGEM DE AMÔNIA

Os níveis de amônia foram quantificados no cérebro dos animais dos grupos controle e infectado no 10^o d.p.i, com a finalidade de avaliar o quadro de encefalopatia hepática. Para isso foi utilizado o kit comercial (Ammonia Assay Kit-Sigma-Aldrich) para a determinação quantitativa e enzimática da amônia nas amostras biológicas. Resumidamente, os animais foram anestesiados e sacrificados no 10^o d.p.i para coleta do cérebro, em seguida, a amostra foi processada de acordo com as orientações do kit. A quantificação foi realizada em um leitor de microplaca, considerando a absorvância de 340nm.

4.10 TRATAMENTO COM LACTULOSE

Para avaliar o efeito da lactulose frente a evolução da doença e as alterações comportamentais, os animais do grupo controle e infectado foram tratados com lactulose na dose 3mg/kg via intraperitoneal de acordo com o protocolo proposto por Xie et al., (2018), a fim de verificar se este dissacarídeo poderia atenuar os danos comportamentais. O delineamento dos grupos experimentais ocorreu conforme a ilustração abaixo:



Os animais do grupo controle infectados receberam lactulose na dose de 3mg/kg via intraperitoneal a partir do dia 1 pós-infecção durante 7 dias consecutivos. Ressalta-se que a lactulose por ser um dissacarídeo osmótico promove várias evacuações, o que implica na perda de água e eletrólitos, portanto os animais que foram tratados com lactulose receberam um repositório hidroeletrolítico (sódio, potássio e glicose) para evitar possíveis complicações em decorrência da perda de fluidos.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo ANOVA (análise de variância) seguido do pós-teste *Tukey-Kramer* (para análise de três ou mais grupos). Todos os testes foram realizados com uso do programa estatístico BioEstat versão 5.0, considerando como significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Nossos resultados iniciais indicam a presença de sinais clínicos característicos da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, em modelo murino de malária não complicada, demonstrando a evolução gradativa dos sinais clínicos como diminuição do apetite, ataxia, alterações na coloração do pelo e distensão abdominal, que se apresentam com uma janela de óbito de até 30 dias pós infecção.

O curso temporal da infecção foi monitorado a partir da determinação da curva de sobrevivência, parasitemia e mensuração da massa corpórea. Observamos que a inoculação dos camundongos com a cepa PbA resultou em uma infecção crônica e letal a partir do 17º d.p.i, quando os animais começaram a evoluir a óbito, destacando-se um aumento acentuada de, aproximadamente, 50% de óbito dos animais no 20º d.p.i. (Figura 6A).

A evolução da parasitemia também foi acompanhada a partir da obtenção de distensões sanguíneas delgadas, a cada 3 dias pós-infecção e observou-se uma progressão lenta e contínua na porcentagem de parasitemia, em que no 3º d.p.i, os animais apresentaram uma parasitemia de ~5%, aumentando, gradativamente, no decorrer dos dias pós-infecção (Figura 6B). Ressalta-se que no 10º d.p.i., os animais apresentavam uma parasitemia de ~11%, condizente com as alterações clínicas dos animais nesta fase da doença, e com o avanço da parasitemia, conforme observado no 20º d.p.i., de ~28%, os animais apresentavam uma exacerbação de seus sinais clínicos.

Além destes parâmetros, também foi avaliada uma possível alteração na massa corpórea dos animais infectados e controle no decorrer dos dias pós-infecção. A massa corpórea dos animais foi mensurada de 3 em 3 dias, permitindo observar que a infecção com a cepa PbA ocasionou alteração no ganho de massa corpórea na fase terminal da doença, destacando uma alteração de massa corpórea a partir do 18º d.p.i. (Figura 6C).

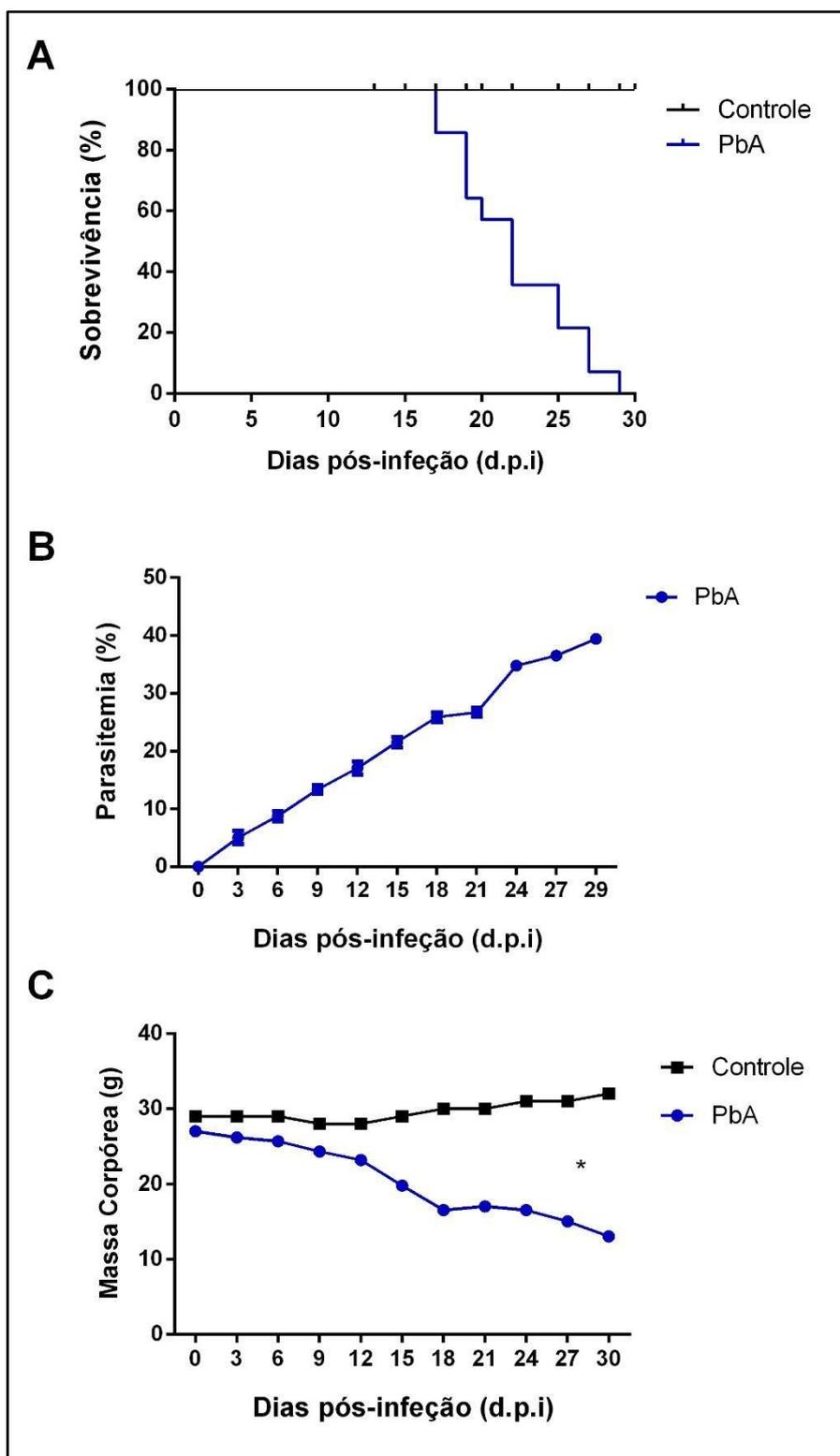


Figura 6: Avaliação do curso temporal da infecção com a cepa PbA. (A) Curva de sobrevivência, apresentando dois grupos experimentais: Controle e PbA (n=15 animais). (B) Porcentagem de parasitemia do grupo PbA. (C) Percentual de massa corpórea demonstrando uma queda lenta e gradual conforme a evolução da parasitemia no grupo infectado com a cepa PbA (* $p < 0,001$ vs PbA).

5.2 A INFECÇÃO POR *Plasmodium Berghei* ANKA INDUZ A FALÊNCIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Uma vez demonstrado na curva de sobrevivência a evolução crônica e gradual da infecção, foi escolhido o 10^o e 20^o d.p.i para as análises das alterações hepáticas. O 10^o d.p.i representa uma alteração na fase inicial da doença, com o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, enquanto o 20^o d.p.i representa a fase mais tardia, demonstrando um comprometimento sistêmico mais evidente.

5.2.1 Avaliação da Hepatoesplenomegalia nos camundongos Balb-C inoculados com a cepa PbA

Na avaliação clínica, os resultados demonstram a presença de icterícia e um aumento da cavidade abdominal, sugerindo um quadro de hepatoesplenomegalia, condição em que o fígado e o baço encontram-se aumentados. Nesse sentido, foi realizado uma análise morfológica do tecido hepático por meio da hepatectomia total e a esplenectomia para avaliar o teor de água nos respectivos órgãos. A figura 7 (A-B) demonstra um quadro evidente de hepatomegalia no 10^o e 20^o d.p.i, caracterizando um distúrbio hepático quando comparado ao grupo controle que mostra o fígado com seu tamanho e coloração padrão.

Na esplenectomia (Figura 7 C-D), também observamos um aumento significativo do baço nos animais infectados no 10^o d.p.i, quando comparado ao grupo controle, indicando que a infecção induz um aumento da resposta imunológica, na tentativa de controlar a infecção.

Diante dos resultados encontrados podemos destacar que no 10^o d.p.i., as alterações no fígado e baço já se encontram bem evidentes, e conforme a progressão da infecção, observamos um quadro sugestivo de lesão, que pode culminar em falência hepática grave.

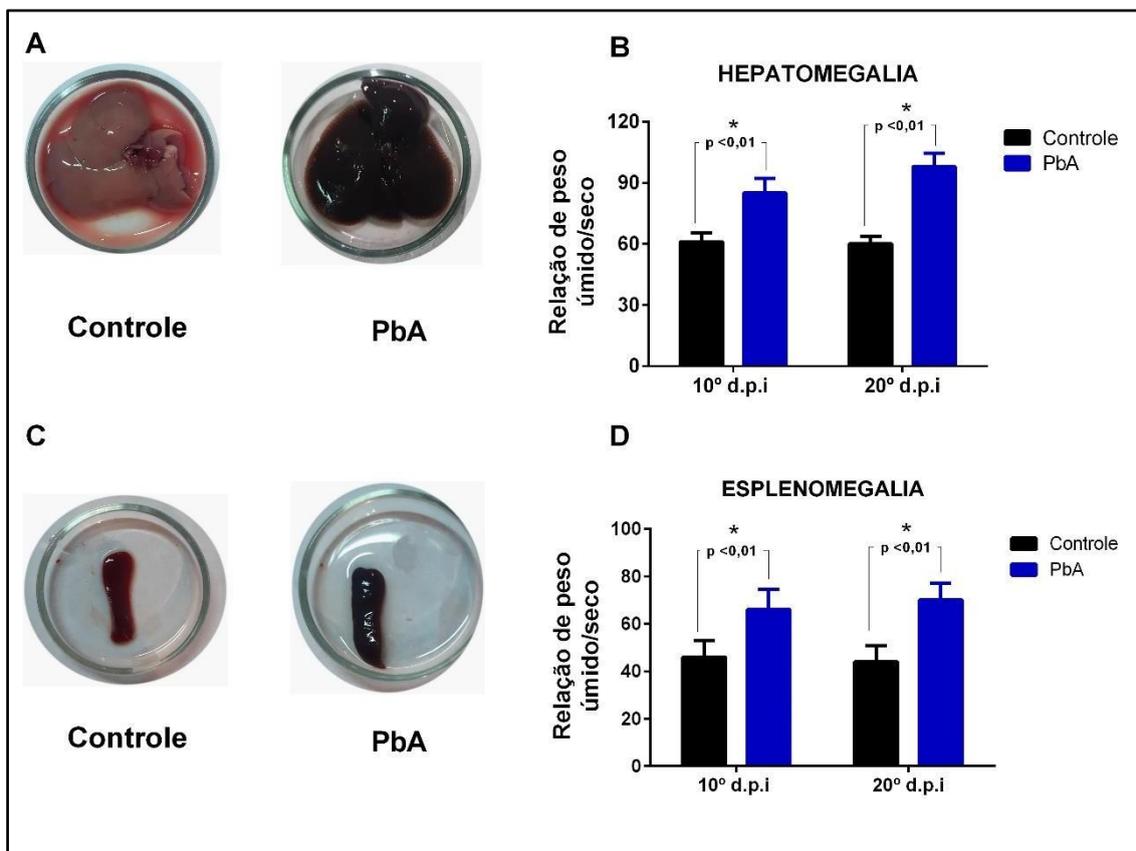


Figura 7: Análise morfológica do Fígado e Baço. (A) Imagem representativa do fígado dos grupos controle e PbA, evidenciando a hepatomegalia no grupo PbA no 10° d.p.i. (B) Teor de água no fígado dos grupos controle e PbA no 10° e 20° d.p.i. (C) Imagem representativa do baço dos grupos controle e PbA, evidencia a esplenomegalia no grupo PbA no 10° d.p.i. (D) Teor de água no baço dos grupos controle e PbA no 10° e 20° d.p.i. Resultados apresentando dois grupos experimentais: Controle e PbA. n=8 (10° d.p.i); n=5 (20° d.p.i). Média±Erro Padrão; p<0.01.

5.2.2 Alterações histopatológicas no fígado dos camundongos da linhagem Balb-C inoculados com a cepa PbA

Para caracterização das alterações histopatológicas presentes no fígado dos camundongos Balb-C inoculados com a cepa PbA foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). A Figura 8 (A-B) demonstra o corte histológico do fígado, evidenciando o aparelho porta normal, constituído de veia hepática, área sinusoidal e hepatócitos circundantes. Não foram observadas a presença de células inflamatórias e, em relação a esteatose nota-se alguns pontos na extensão do tecido. No tecido hepático de camundongos infectados com a cepa PbA (Figura 8 C-D) é possível observar a área sinusoidal um pouco mais alargada, além da deposição do pigmento malárico Hemozoína dentro das células de Kupffer hiperplásicas, bem como a presença de células inflamatórias no trato portal. Além disso, nota-se que as áreas sinusoidais se apresentam, frequentemente, como estruturas congestionadas.

As alterações encontradas no fígado podem variar em escala de 0 a 3, sendo 0 pouca ou nenhuma alteração e 3 alterações mais graves. A tabela 3 mostra o grau das alterações encontradas nos grupos controle e PbA no 10^o e 20^o d.p.i. evidenciando uma diferença significativa entre os dias pós infecção. A análise da gradação histopatológicas confirma os resultados encontrados nos cortes histológicos, indicando que o grupo PbA mostrou alterações mais graves em relação aos parâmetros como: hiperplasia das células de Kupffer, congestão sinusoidal e deposição da hemozoína, exacerbando no 20^o d.p.i.

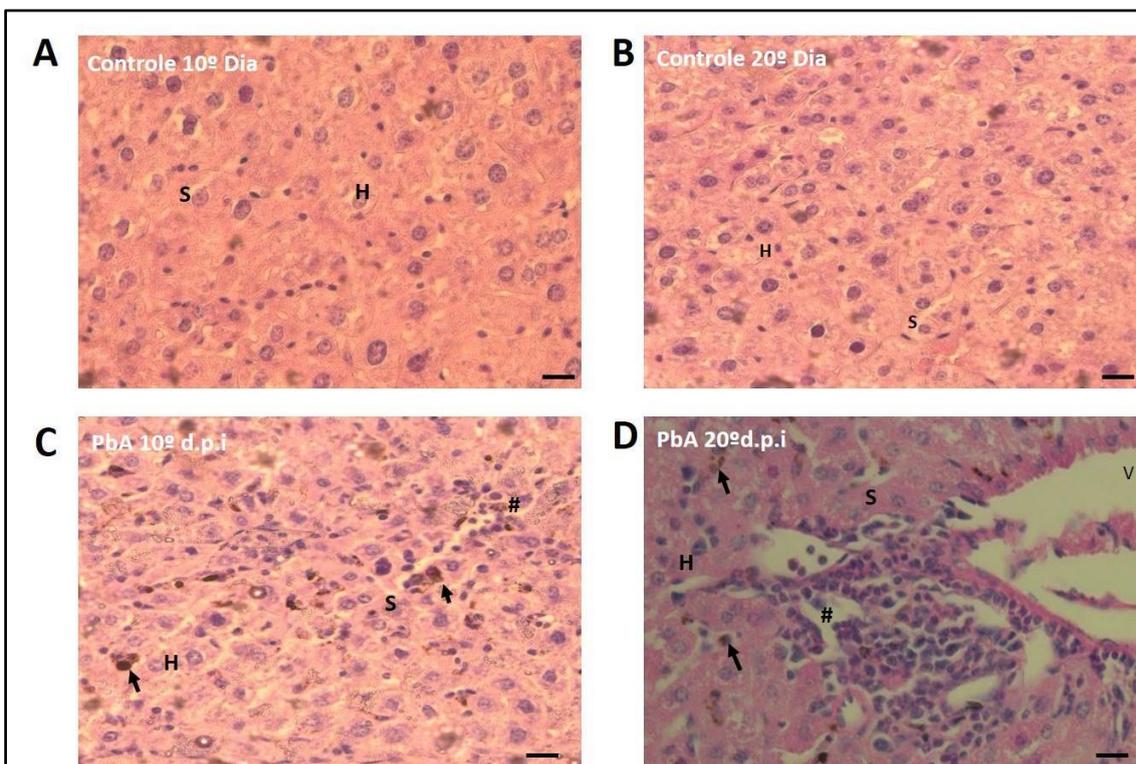


Figura 8: Representação Histológica do tecido hepático do grupo controle sem alteração tecidual (A-B); Grupo PbA 10º d.p.i (C) e grupo PbA 20º d.p.i (D), evidenciando a desorganização tecidual com a presença de infiltrados e pigmento malárico. Imagens de A-D são mostradas em aumento de 400x; H- Hepatócitos H, V- veia hepática, S- área sinusoidal, # - Células inflamatórias, Seta- Células de Kupffer com pigmento malárico (hemozoína).

Tabela 3: Gradação Histopatológica do tecido hepático de camundongos infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*.

Alterações histopatológicas	Gradação histopatológica		
	Controle	PbA 10º Dia	PbA 20º Dia
Esteatose	1	0	0
Hiperplasia das Células de Kupffer	0	2	3
Congestão sinusoidal	0	1	3
Deposição da Hemozoína	0	2	2
Total	1/12	5/12	8/12

5.2.3 Determinação bioquímica do perfil hepático

Uma vez demonstrado que o tecido hepático apresenta alterações morfológicas e histológicas, buscou-se então a caracterização das alterações bioquímicas, por meio da dosagem sérica dos indicadores de lesão hepática, como as transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

A figura 9 A-B, mostra o aumento dos níveis de AST e ALT no plasma do grupo PbA em comparação ao grupo controle, no 10^o e 20^o d.p.i. A dosagem das transaminases é utilizada para avaliar a função hepática, bem como auxiliar no diagnóstico de doenças hepáticas. Altos níveis das transaminases no sangue podem indicar danos no fígado, já que essas enzimas normalmente são encontradas dentro das células hepáticas e sua liberação para corrente sanguínea indica lesão ou inflamação no fígado.

Os níveis de bilirrubina total (BT) e bilirrubina direta (BD) também foram quantificados, uma vez que são importantes marcadores de lesões hepáticas. A figura 10 C-D, demonstra um aumento significativo dos valores de BT e BD, no 10^o e 20^o d.p.i. Nesse sentido, nossos dados bioquímicos demonstram que a infecção com a cepa PbA altera o parênquima hepático e com a evolução da infecção essas lesões se tornam mais evidentes.

Dessa forma, uma vez caracterizada a evolução da lesão hepática em decorrência da infecção com a cepa PbA, bem como a confirmação de que nosso modelo experimental desenvolve alterações sistêmicas, as análises seguintes serão voltadas para investigar o comprometimento no sistema nervoso central, a partir de uma alteração no fígado, levando, possivelmente, a um quadro de encefalopatia hepática.

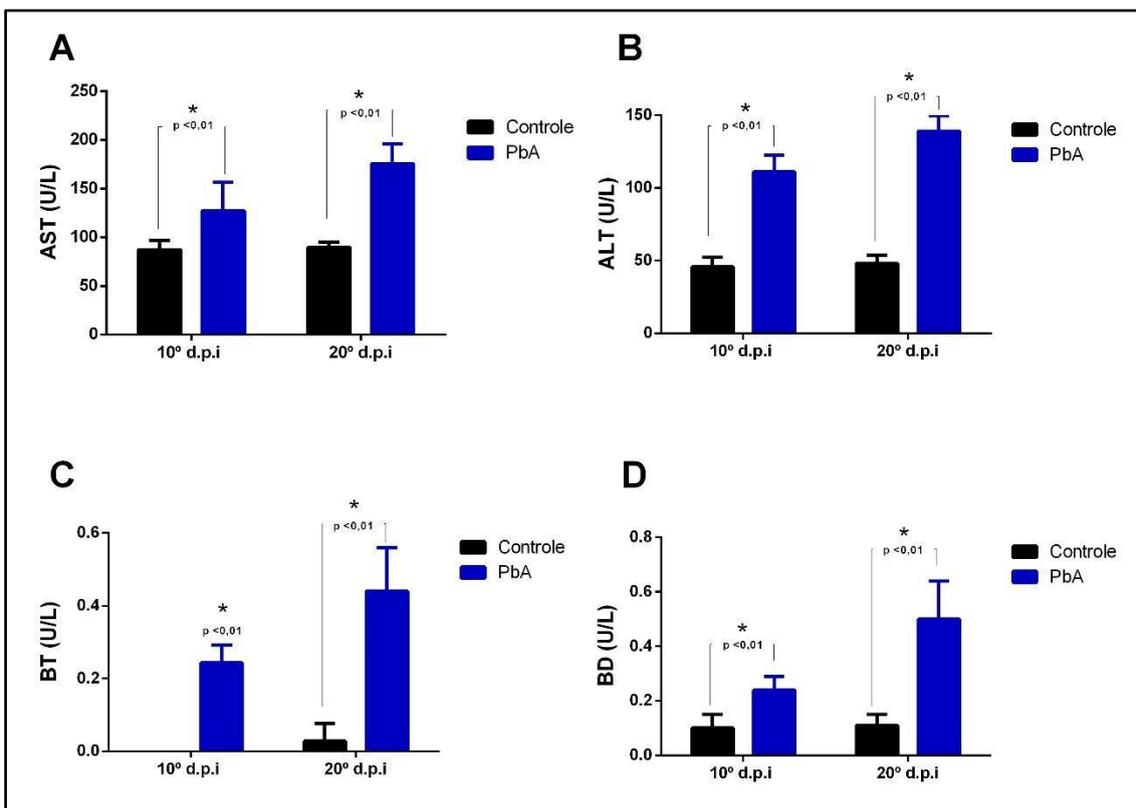


Figura 9: Atividade das enzimas hepáticas em camundongos Balb-C controle e infectados com Cepa ANKA. Níveis da Aspartato Aminotransferase (A), Alanina aminotransferase (B), Bilirrubina Total (C), Bilirrubina Direta (D). As análises foram realizadas no 10^o e 20^o d.p.i. Dados apresentados em Média±Erro Padrão; p<0.01.

5.3 A INFECÇÃO POR *Plasmodium* Berghei ANKA INDUZ ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

5.3.1 Alterações comportamentais em modelo murino de malária não complicada

A avaliação do comportamento, foi realizada inicialmente pelo teste do campo aberto, no qual os dados demonstram que o grupo PbA apresenta alterações na atividade locomotora, exploração e diminuição do número de quadrantes cruzados no 10^o d.p.i (CONTROLE= 213,16±3,81 vs PbA=125,25±12,50; $p<0,01$), bem como no 20^o d.p.i, em que observamos que essas alterações se intensificaram (CONTROLE= 230±5,22 vs PbA=50±9,28; $p<0,01$), demonstrando assim, que mesmo em modelo de malária não complicada, a infecção com a cepa ANKA causa significativo prejuízo locomotor (FIGURA 10 A).

Além deste parâmetro, também foram analisados a frequência de rearing e grooming que são indicadores importantes para avaliar o comportamento natural do animal. Na avaliação do rearing, observamos uma diminuição significativa do grupo PbA quando comparado com o grupo controle no 10^o d.p.i (CONTROLE= 25,83±2,16 vs PbA=15±2,82; $p<0,01$) e 20^o d.p.i (CONTROLE= 30,81±2,18 vs PbA=5,21±1,28; $p<0,01$), evidenciando que os animais infectados apresentavam dificuldade para realizar o apoio sobre as patas traseiras. Ao avaliarmos o grooming que se caracteriza por um comportamento de higiene, observamos a diminuição gradativa deste comportamento no grupo PbA no dia 10^o d.p.i e 20^o d.p.i, quando comparado ao grupo controle 10^o d.p.i (CONTROLE=13,13±2,94 vs PbA=7,83±3,94; $p<0,01$) e 20^o d.p.i (CONTROLE= 15,21±3,18 vs PbA=5,54±2,28; $p<0,01$).

Nossos dados demonstram que as alterações comportamentais foram bem evidentes tanto no 10^o quanto no 20^o d.p.i, evidenciando que a infecção com a cepa ANKA em modelo de malária não complicada, provoca danos comportamentais que podem estar associados as alterações hepáticas (FIGURA 10 B-C).

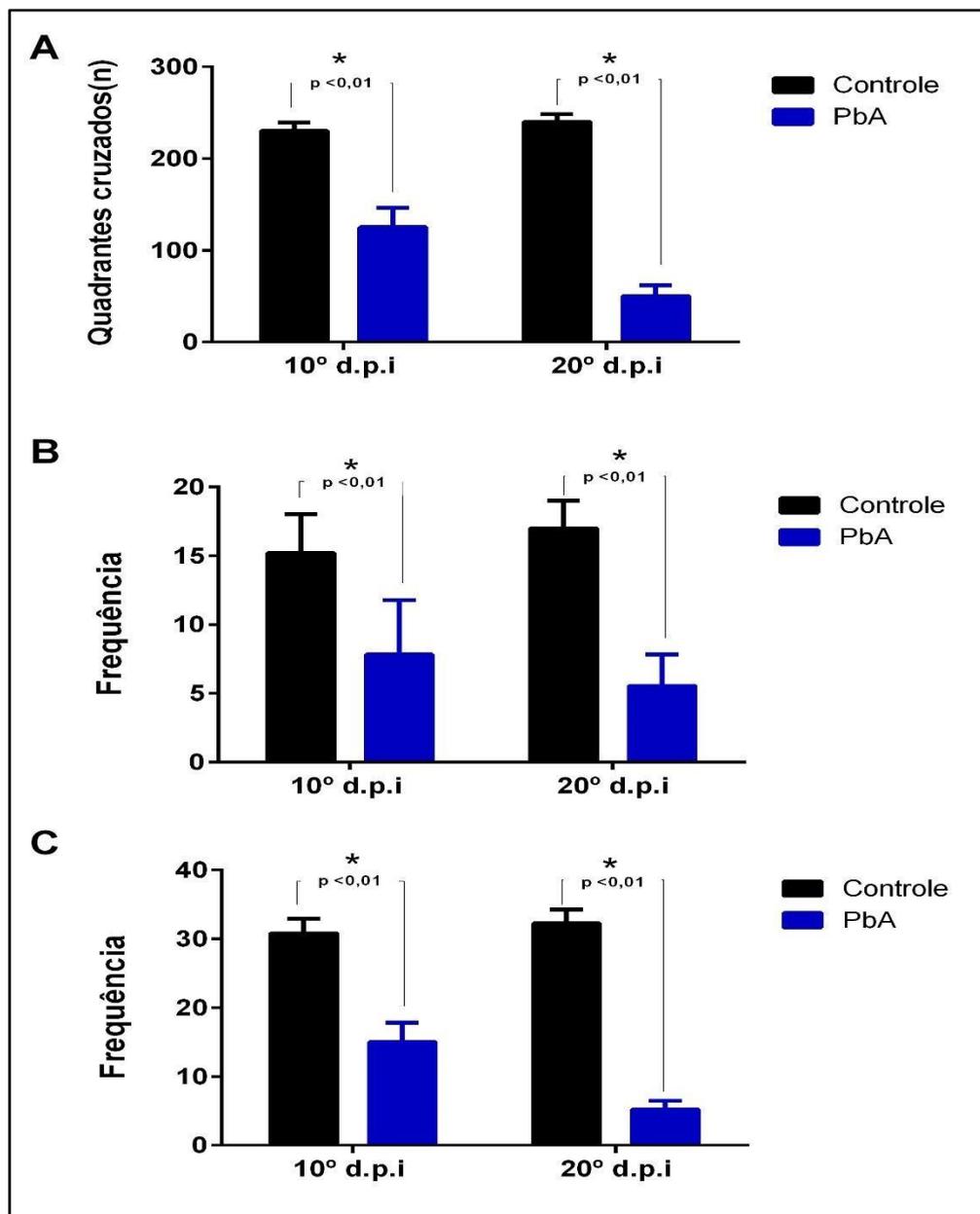


Figura 10: Análise do campo aberto dos grupos controle e PbA, no 10° e 20° d.p.i., (n=10). (A) Número de quadrantes cruzados, avaliado pela exploração do animal durante 5 min de teste, (B) frequência do comportamento Grooming e (C) frequência de rearing. Considerando $p < 0,01$ PbA vs controle; Dados apresentados em Média \pm ErroPadrão.

As alterações cognitivas e comportamentais também foram avaliadas pelo protocolo SHIRPA, o qual faz uma análise minuciosa das diversas alterações comportamentais do animal. A avaliação do protocolo SHIRPA, como descrito anteriormente, se baseia na análise de domínios como o comportamento motor, força e tônus muscular, aspectos neuropsiquiátrico, reflexo e função sensorial e função autonômica.

Na figura 11A, observamos alterações significativas no grupo PbA no parâmetro relacionado ao comportamento motor, como alteração da marcha, encurvamento do tronco e alteração da posição corporal no 10º d.p.i e 20º d.p.i.; (CONTROLE= $2,70 \pm 0,55$ vs PbA 10º Dia= $1,72 \pm 0,60$, $p < 0,01$ vs PbA 20º Dia= $0,94 \pm 0,05$, $p < 0,01$).

Outro parâmetro analisado pelo protocolo SHIRPA, foi a força e tônus muscular, em que também foram observados alterações como diminuição da força ao agarrar no grupo PbA no 10º e 20º d.p.i. (CONTROLE= $2,58 \pm 0,55$ vs PbA 10º Dia= $1,83 \pm 0,10$, $p < 0,01$ vs PbA 20º Dia= $0,8 \pm 0,27$, $p < 0,01$) (Figura 11 B).

A análise do parâmetro de reflexo e função sensorial, demonstrou um diminuição do reflexo auricular, reflexo de endireitamento e diminuição do estímulo das patas traseiras no grupo PbA quando comparado ao grupo controle no 10º e 20º d.p.i., (CONTROLE= $2,56 \pm 0,51$ vs PbA 10º Dia= $1,81 \pm 0,36$, $p < 0,01$ vs PbA 20º Dia= $0,96 \pm 0,08$, $p < 0,01$); (Figura 11 C).

O aspecto neuropsiquiátrico também apresentou alterações no escape ao toque, diminuição da mordida e ausência de vocalização no grupo PbA no 10º e 20º d.p.i., (CONTROLE= $2,05 \pm 0,40$ vs PbA 10º Dia= $1,55 \pm 0,31$, $p < 0,01$ vs PbA 20º Dia= $1,08 \pm 0,12$, $p < 0,01$) (Figura 11 D).

A função autonômica é um parâmetro que avalia a piloereção, salivação e fechamento das pálpebras nos animais, dessa forma, o grupo PbA apresentou diminuição e/ou ausência desses reflexos, demonstrando que a infecção na fase inicial (10º d.p.i) e na fase tardia (20º d.p.i) altera reflexos que são esperados em um animal saudável (CONTROLE= $1,15 \pm 0,23$ vs PbA 10º Dia= $0,86 \pm 0,17$, $p < 0,01$ vs PbA 20º Dia= $0,32 \pm 0,17$, $p < 0,01$) (Figura 11 E).

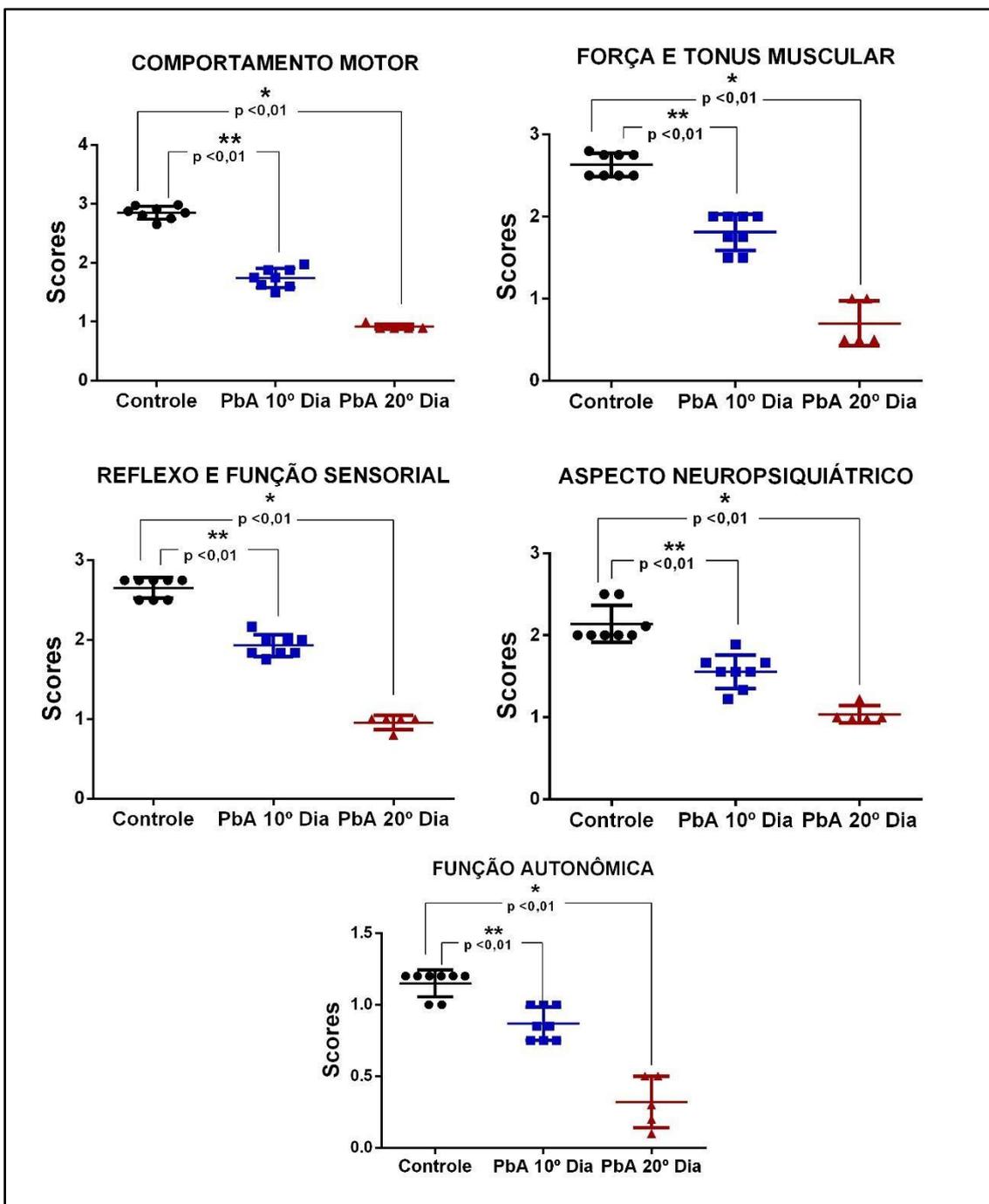


Figura 11: Comprometimento comportamental no 10º e 20º dia após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária. O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: Comportamento motor, força e tônus muscular, reflexo e função sensorial, estado neuropsiquiátrico e função autonômica utilizando o protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação individual (n=8) e os dados estão expressos como média ± SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. *p<0,01 PbA vs Controle.

5.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO TECIDO CEREBRAL EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Após a caracterização das alterações comportamentais, avaliou-se morfologicamente o tecido cerebral, em decorrência dos danos encontrados nos testes comportamentais. Foi analisada a área do córtex pré-frontal, o qual é responsável por funções como memória e motricidade.

A Figura 12 A-B mostra a estrutura do córtex pré-frontal do animal controle, com um padrão de tecido sem inflamação e parênquima com organização tecidual. Em contrapartida, a análise tecido cerebral de um animal infectado, observa-se um parênquima desorganizado, com retração celular e intensa vacuolização no 10^o e 20^o d.p.i., bem como a presença de infiltrados celulares, dilatação vascular e áreas com focos hemorrágicos (Figura 12 C-D).

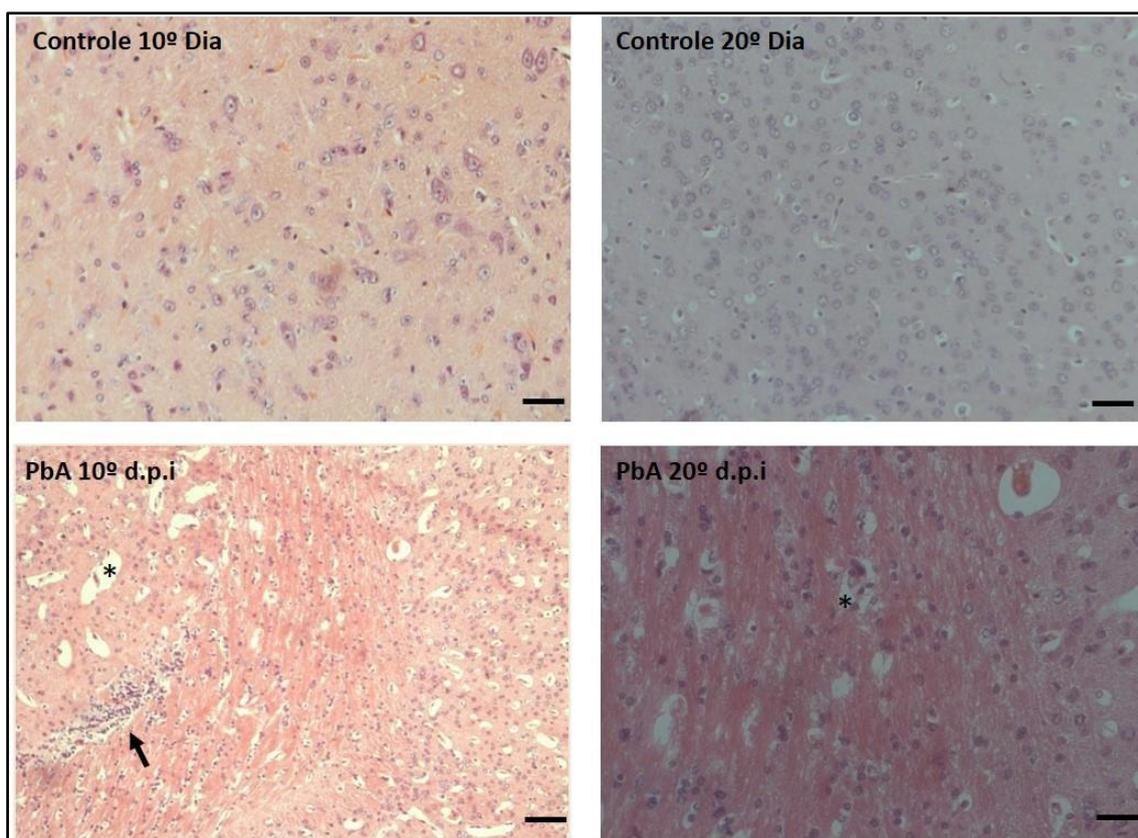


Figura 12: As alterações histopatológicas do tecido cerebral do grupo controle 10^o dia (A), grupo controle 20^o dia (B), mostrando um parênquima normal; Grupo PbA 10^o d.p.i (C) e grupo PbA 20^o d.p.i (D), mostrando infiltração celular (seta) desorganização tecidual e vacuolização. Imagens de A-D são mostradas em aumento de 100x;

5.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA E INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

A formação de edema é uma complicação de causa multifatorial, o qual pode ocorrer quando há o acúmulo anormal de líquido no cérebro, provocando sinais e sintomas como, convulsão e coma. Ao avaliar a formação de edema no cérebro dos animais controle e PbA no 10^o e 20^o d.p.i., foi possível observar que a infecção com a cepa ANKA provocou um aumento significativo no teor de água cerebral, destacando-se o 20^o d.p.i. no qual havia a formação de edema com a presença de sinais clínicos característicos do inchaço cerebral como a perda de força, ataxia e coma (Figura 13A).

A avaliação da integridade da barreira hematoencefálica se apresenta como uma importante ferramenta para verificar alterações ou complicações no SNC. Os animais do grupo controle e PbA foram submetidos ao ensaio de permeabilidade vascular no 10^o e 20 d.p.i., com o intuito de avaliar se as alterações neurológicas encontradas nos testes comportamentais estavam relacionadas com a quebra da BHE, uma vez o modelo experimental usado não desenvolve a quebra da barreira forma clássica, ou seja, não expressa as moléculas de adesão para os eritrócitos parasitados.

Nossos resultados demonstram que no 10^o d.p.i não houve diferença estatística entre os grupos, ou seja, não foi observada a presença de extravasamento vascular. Em contrapartida, no 20^o d.p.i., foi observado uma acentuada quebra da BHE, o qual pode ser justificada em decorrência das alterações hepáticas demonstrada nos resultados anteriores, evidenciando que o quadro de encefalopatia hepática quando instalado, evolui para complicações no sistema nervoso, podendo culminar para a ruptura da BHE (Figura 13B).

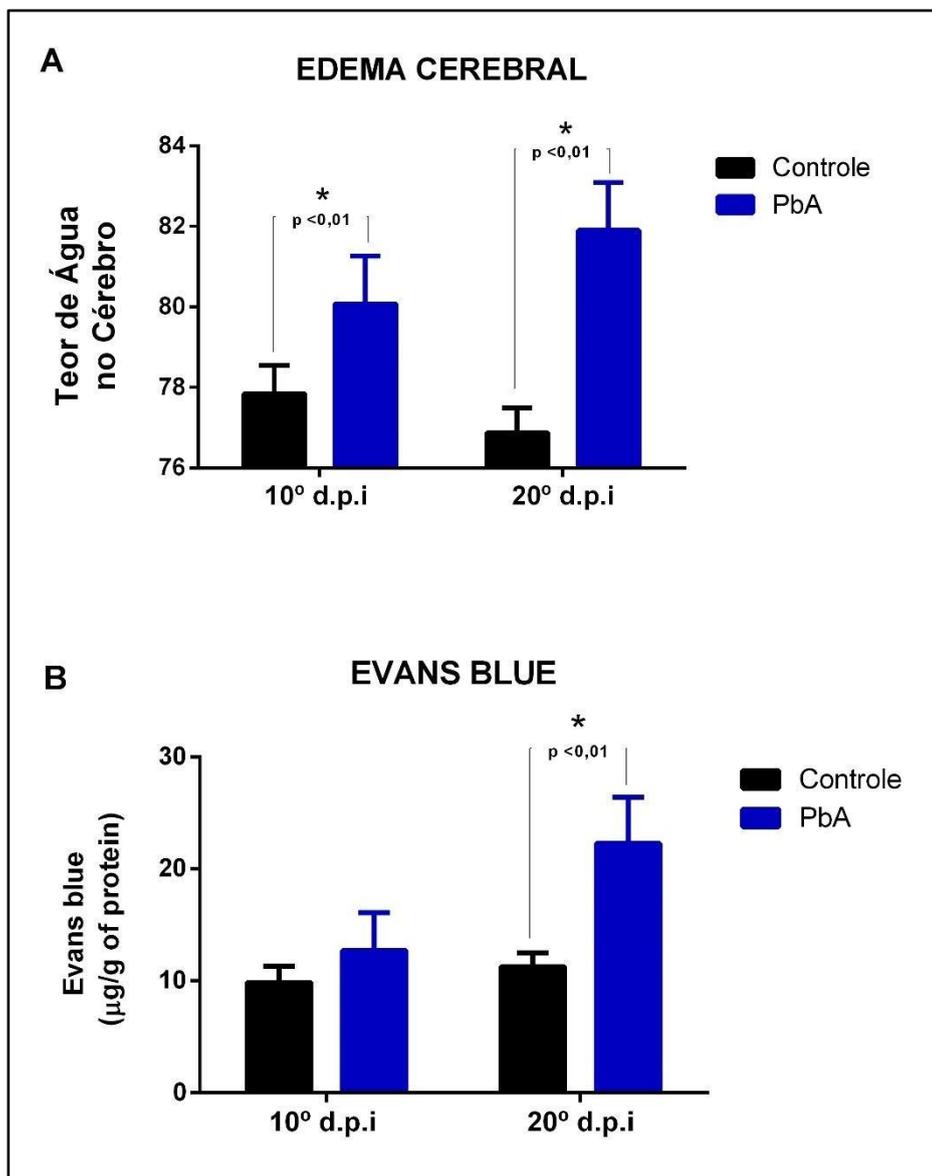


Figura 13: Avaliação do parênquima cerebral dos grupos controle e PbA, pela quantificação do teor de água no cérebro (A) e pelo ensaio de permeabilidade vascular (B). As análises foram realizadas no 10° e 20° d.p.i. Dados apresentados em Média±Desvio Padrão; $p < 0.01$.

5.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS EM MODELO MURINO DE MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Uma vez caracterizado a presença de edema cerebral e quebra da BHE, buscamos avaliar a possível participação dos sistemas de neurotransmissão, realizando o ensaio de liberação dos principais neurotransmissores do SNC, glutamato e GABA, visto que, podem estar alterados em decorrência do quadro de encefalopatia hepática, bem como podem estar relacionados com as alterações comportamentais observadas nos resultados anteriores.

Dessa forma, o tecido cerebral dos animais do grupo controle e PbA foram submetidos ao ensaio de liberação de glutamato e GABA no 10^o e 20^o d.p.i. Com relação aos níveis de liberação de glutamato, foi observado uma redução significativa no tecido cerebral dos animais infectados no 10^o e 20^o d.p.i., conforme a progressão da infecção, quando comparado com o grupo controle, o qual pode estar associado ao quadro de encefalopatia hepática. (Figura 14A).

Entretanto, com relação aos níveis de GABA (Figura 14B), foi observado um aumento significativo do seu nível no grupo PbA quando comparado ao controle no 10^o e 20^o d.p.i., demonstrando que a infecção com a cepa ANKA causa um aumento no tônus GABAérgico em virtude de uma possível hiperamonemia o qual estimula a produção de neuroesteróides culminando no aumento dos níveis de GABA, que por sua vez pode estar relacionado com os achados neurológicos.

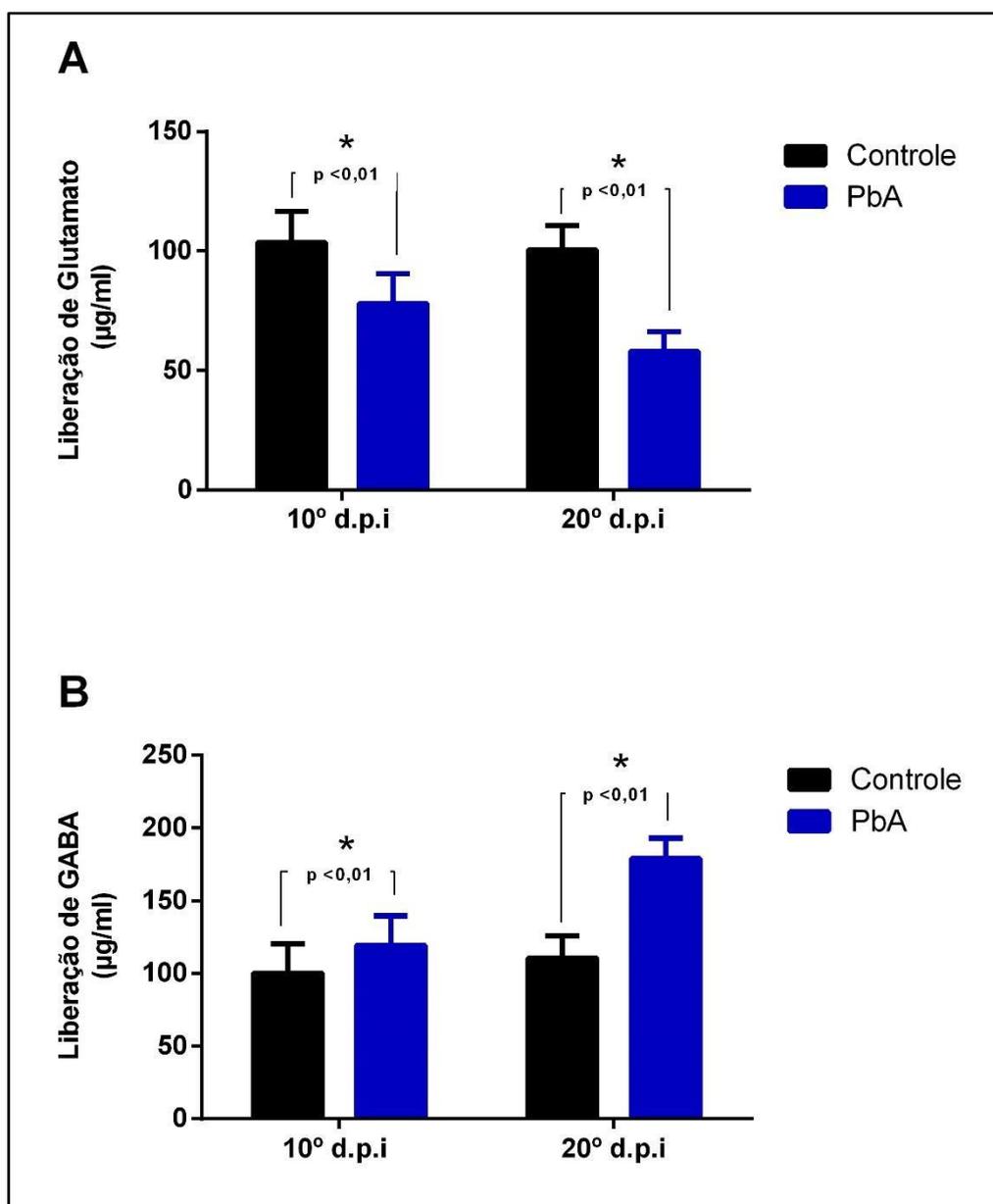


Figura 14: Liberação de GABA e Glutamato no tecido cerebral de camundongos Balb-c controle e infectado pela cepa PbA no 10° e 20° d.p.i. Dados expressos em Média±Desvio Padrão; n=8 no 10° e n=5 no 20° d.p.i.; *p<0,01 vs PbA.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α E ATIVAÇÃO DA MICROGLIA

Com o objetivo de correlacionar as alterações histopatológicas, comportamentais e neuroquímicas com o aumento da resposta inflamatória no modelo murino de malária não complicada, buscou-se caracterizar a resposta inflamatória no plasma e cérebro dos animais controle e PbA no 10^o e 20^o d.p.i.

Dessa forma, realizamos a técnica de imunofluorescência para avaliar a imunomarcação para a proteína Iba-1, a qual é expressa na micróglia. Nossos achados demonstram uma marcação positiva na região do córtex pré-frontal do grupo PbA, conforme evidenciado na figura 15 A, no qual destacamos a presença de células retraídas, características da ativação microglial. Esse resultado comprova que as alterações encontradas na área motora, na análise do 10^o e 20^o d.p.i., provocam uma intensa alteração no SNC, com uma resposta celular ativa da micróglia.

Para caracterizarmos a resposta inflamatória, no modelo de malária não complicada, realizamos a dosagem do TNF- α , no plasma e tecido cerebral dos animais controles e infectados com a cepa PbA, no 10^o e 20^o d.p.i. Nossos resultados demonstram que os animais do grupo PbA apresentaram um aumento dos níveis de TNF- α no plasma, evidenciando um aumento de resposta inflamatória no 10^o d.p.i quando comparado com o grupo controle. Esse aumento foi ainda mais evidente no 20^o d.p.i. em comparação com o grupo controle (Figura 15B).

O mesmo pode ser observado no córtex dos animais infectados, no 10^o e 20^o d.p.i., deixando evidente que o aumento dos níveis de TNF- α também podem estar relacionados com as complicações comportamentais encontradas no decorrer da infecção (Figura 15C).

Uma vez caracterizado o processo inflamatório sistêmico e central, em decorrência das alterações encontradas no fígado, nosso próximo objetivo buscou identificar uma possível participação da amônia como principal agente envolvido na patogênese da malária não complicada, ocasionando os danos no SNC.

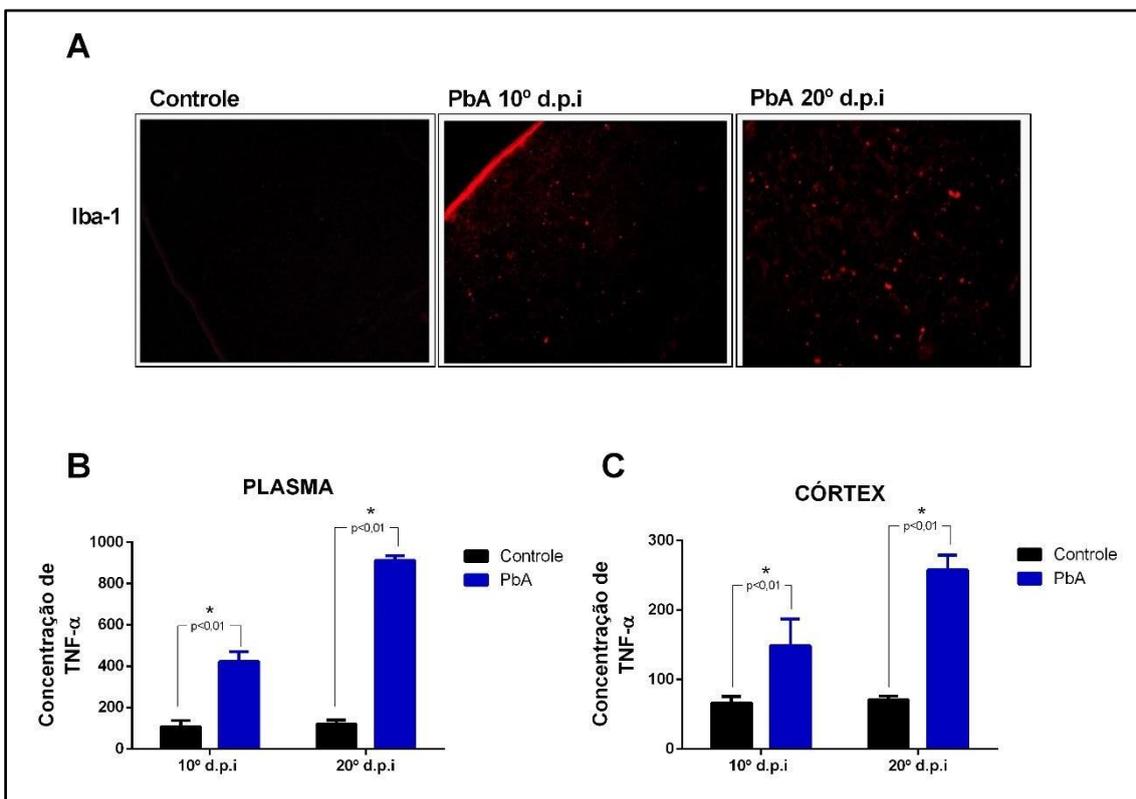


Figura 15: Análise da imunomarcção para Iba1 (vermelho) por microscopia de fluorescência em cortes cerebrais o grupo controle e PbA no 10° e 20° d.p.i (A) (lente objetiva 20x); Concentração de TNF- α no plasma (B) e cérebro de camundongos controle e infectados com a cepa PbA, no 10° e 20° d.p.i. (C). Dados expressos pela média dos grupos. * Infectado vs Controle; dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão; $p < 0.01$.

5.8 A LESÃO HEPÁTICA INDUZ O AUMENTO DOS NÍVEIS DE AMÔNIA NO CÉREBRO DOS ANIMAIS COM MALÁRIA NÃO COMPLICADA

Um dos principais indicativos do quadro de encefalopatia hepática é o aumento dos níveis de amônia no cérebro, uma vez que o fígado é o órgão responsável pelo metabolismo dessa neurotoxina. Uma vez demonstrado a falência hepática e, conseqüentemente, a presença de alterações cognitivas e comportamentais, buscou-se avaliar os níveis de amônia no cérebro dos animais controle e PbA na fase inicial da infecção.

Nesse sentido, a figura 16 mostra um aumento dos níveis de amônia no tecido cerebral, no 10^o d.p.i. Esse resultado, demonstra um quadro de hiperamonemia no grupo PbA, que induz uma série de alterações no cérebro, e que possivelmente pode ter culminado para a quebra da BHE e ocasionado os danos neurológicos apresentados pelo grupo PbA. Dessa forma, se faz necessário, a confirmação do papel da amônia frente as alterações encontradas em nossos resultados.

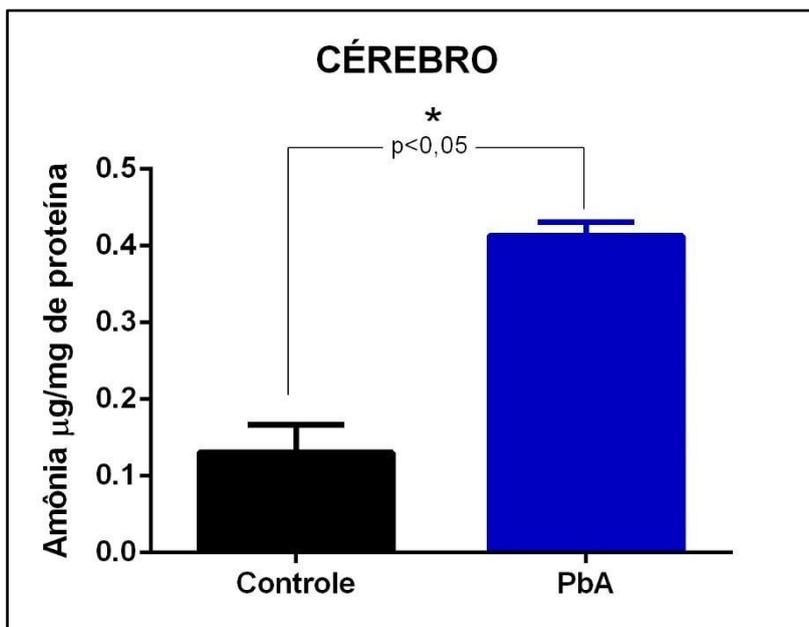


Figura 16: Quantificação dos níveis de amônia no cérebro dos animais infectados e controle no 10^o d.p.i. Dados expressos pela média dos grupos. * PbA vs Controle; dados apresentados em Média±Desvio Padrão; p<0.05.

5.9 A REMOÇÃO DA AMÔNIA AUMENTA A SOBREVIDA E ATENUA OS DANOS COMPORTAMENTAIS DOS ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA ANKA de *Plasmodium berghei*

Nossos resultados anteriores demonstram que a infecção com a cepa ANKA, em modelo murino de malária não complicada, ocasiona alterações hepáticas e que tais alterações quando não tratadas evoluem para um quadro de encefalopatia hepática, como demonstrado pelo aumento na produção de amônia, induzindo alterações centrais como, edema e extravasamento cerebral, exacerbação da neuroinflamação pela ativação da micróglia, produção de citocinas e desregulação do sistema de neurotransmissão, culminando com as alterações cognitivas e comportamentais.

O presente trabalho propôs utilizar a lactulose como agente fisiológico, regulando a integridade intestinal e removendo a amônia do sistema. Dessa forma, utilizamos a lactulose na dose 3mg/kg como alternativa para ratificar a correlação entre as alterações hepáticas e as alterações centrais. A utilização da lactulose foi escolhida baseada em estudos prévios em modelo de encefalopatia hepática, visto que essa molécula consegue reduzir os níveis de amônia, uma toxina que está envolvida na gênese da EH, melhorando assim as alterações neurológicas em pacientes e modelos murino de encefalopatia hepática.

Para isso, os animais foram infectados com a cepa ANKA e tratados com lactulose na dose de 3mg/kg por 7 dias após a infecção. Após o início da infecção foram observados os sinais clínicos dos grupos PbA e PbA+Lactulose 3mg/kg, sendo avaliado o curso temporal da doença, obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência e parasitemia desses animais após o início da infecção.

Nossos resultados demonstram que a inoculação dos camundongos Balb-C com a cepa PbA resultou em uma infecção crônica que se iniciou no 10^o d.p.i., mantendo-se até o 18^o d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência no 15^o d.p.i. (Figura 17). Contudo, ao avaliarmos o efeito da lactulose sobre o a evolução temporal da doença, observamos que os animais infectados e tratados com a lactulose na dose de 3mg/kg, apresentavam um percentual de sobrevivência de 80%, demonstrando que o tratamento consegue prolongar a

sobrevida dos animais, bem como atenuar a presença dos sinais clínicos característicos da infecção.

A evolução da parasitemia também foi acompanhada a partir da obtenção de distensões sanguíneas a cada 3 dias pós-infecção, no qual podemos observar a progressão padrão da porcentagem de parasitemia em todos os grupos experimentais, demonstrando que o tratamento com a lactulose não altera os níveis de parasitemia, uma vez que não apresenta um efeito periférico (Figura 17).

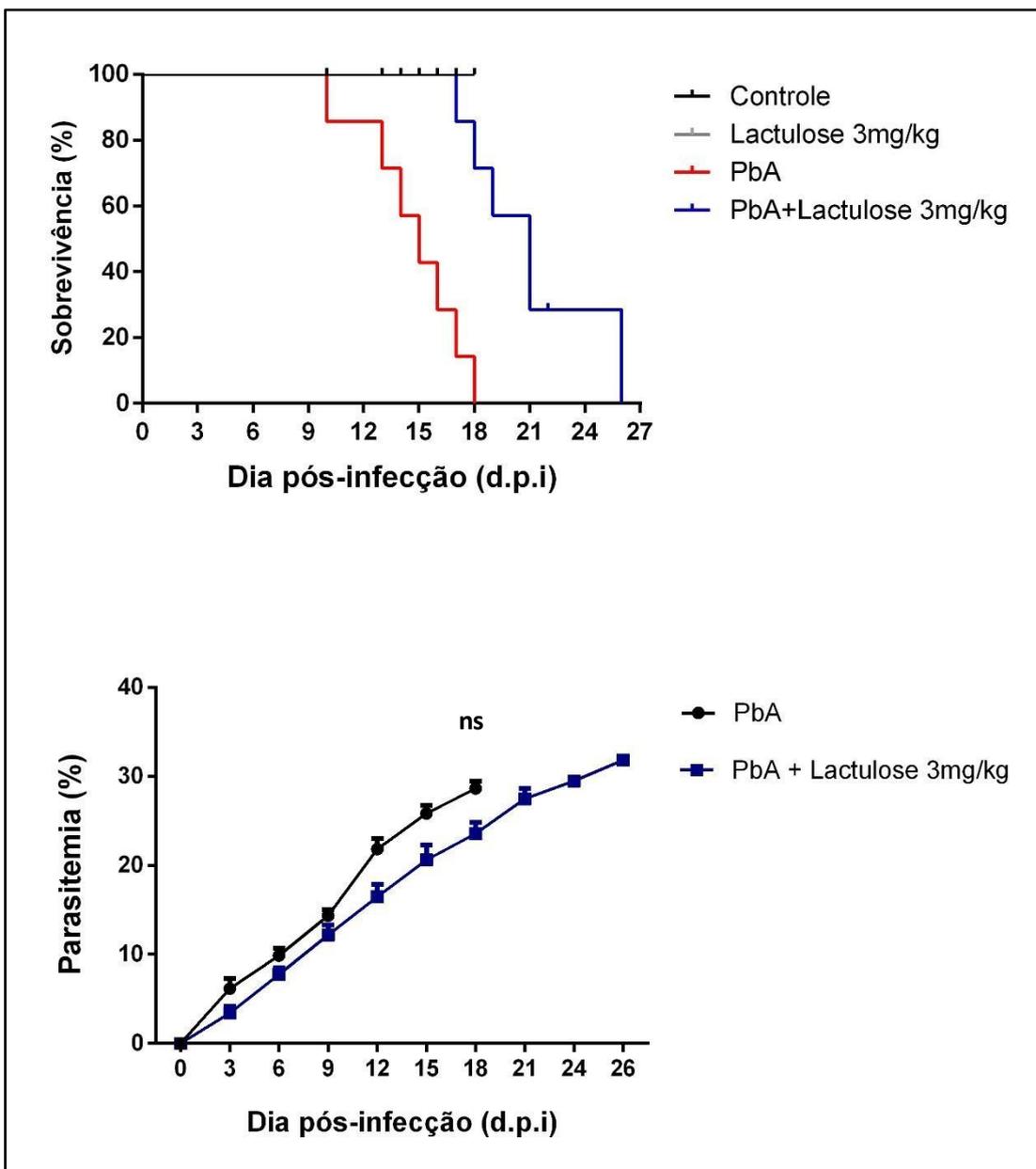


Figura 17: Efeito do tratamento com a lactulose na curva de Sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa ANKA. (A) Tratamento com lactulose aumenta a sobrevida dos animais infectados ($p < 0,01$ teste log rank). (B) Porcentagem de parasitemia dos grupos PbA e PbA+Lactulose 3mg/kg (ns: não significativo). Os resultados apresentados estão expressos em Média±Desvio padrão ($n=8$).

Após o resultado da curva de sobrevivência ter demonstrado um aumento da sobrevivência dos animais, buscou-se avaliar se a remoção da amônia pela lactulose teria algum impacto relacionado aos achados neurocomportamentais no grupo PbA.

Para isso foi realizado o teste comportamental SHIRPA, em que os animais foram infectados e tratados com lactulose na dose de 3mg/kg, para posteriormente realizar a análise no 10º dia pós infecção.

Como descrito anteriormente, o protocolo SHIRPA é uma importante ferramenta para análise dos danos cognitivos e comportamentais, uma vez que avalia diferentes domínios funcionais. Nesse sentido, ao aplicarmos o protocolo no grupo PbA foi possível observar alterações no comportamento motor, quando comparado com o grupo controle (CONTROLE= $2,89 \pm 0,12$ vs PbA 10º d.p.i.= $1,89 \pm 0,14$, $p < 0,01$).

Em contrapartida, o grupo PbA+Lactulose 3mg/kg apresentou uma atenuação das alterações do comportamento motor, evidenciando uma melhora significativa da marcha e posição corporal dos animais (PbA+Lactulose 10º d.p.i.= $2,52 \pm 0,24$, $p < 0,01$).

Também observamos uma resposta positiva do grupo PbA+Lactulose nos demais parâmetros analisados como a força e tônus muscular (CONTROLE= $2,84 \pm 0,18$ vs PbA 10º Dia= $1,87 \pm 0,20$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $2,34 \pm 0,26$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $1,81 \pm 0,23$, $p < 0,01$), reflexo e função sensorial, principalmente no parâmetros de reflexo auricular e reflexo de endireitamento (CONTROLE= $2,73 \pm 0,13$ vs PbA 10º Dia= $1,94 \pm 0,22$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $2,15 \pm 0,27$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 20º Dia= $1,71 \pm 0,14$, $p < 0,01$), aspecto neuropsiquiátrico no parâmetros escape ao toque e vocalização (CONTROLE= $2,87 \pm 0,15$ vs PbA 10º Dia= $1,59 \pm 0,21$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $2,15 \pm 0,42$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 20º Dia= $1,91 \pm 0,30$, $p < 0,01$) e função autonômica nos parâmetros de micção, defecação e fechamento das pápebras (CONTROLE= $1,15 \pm 0,09$ vs PbA 10º Dia= $0,69 \pm 0,13$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $0,97 \pm 0,13$, $p < 0,01$ vs PbA+Lactulose 10º Dia= $0,64 \pm 0,15$) (FIGURA 18).

A utilização da lactulose na dose de 3mg/kg atenua os danos neurológicos dos animais com malária não complicada, demonstrando que as alterações comportamentais são provenientes de um quadro de encefalopatia hepática, ocasionada pelo aumento dos níveis de amônia no córtex dos animais infectados, associado a outros fatores como aumento da resposta inflamatória e edema cerebral.

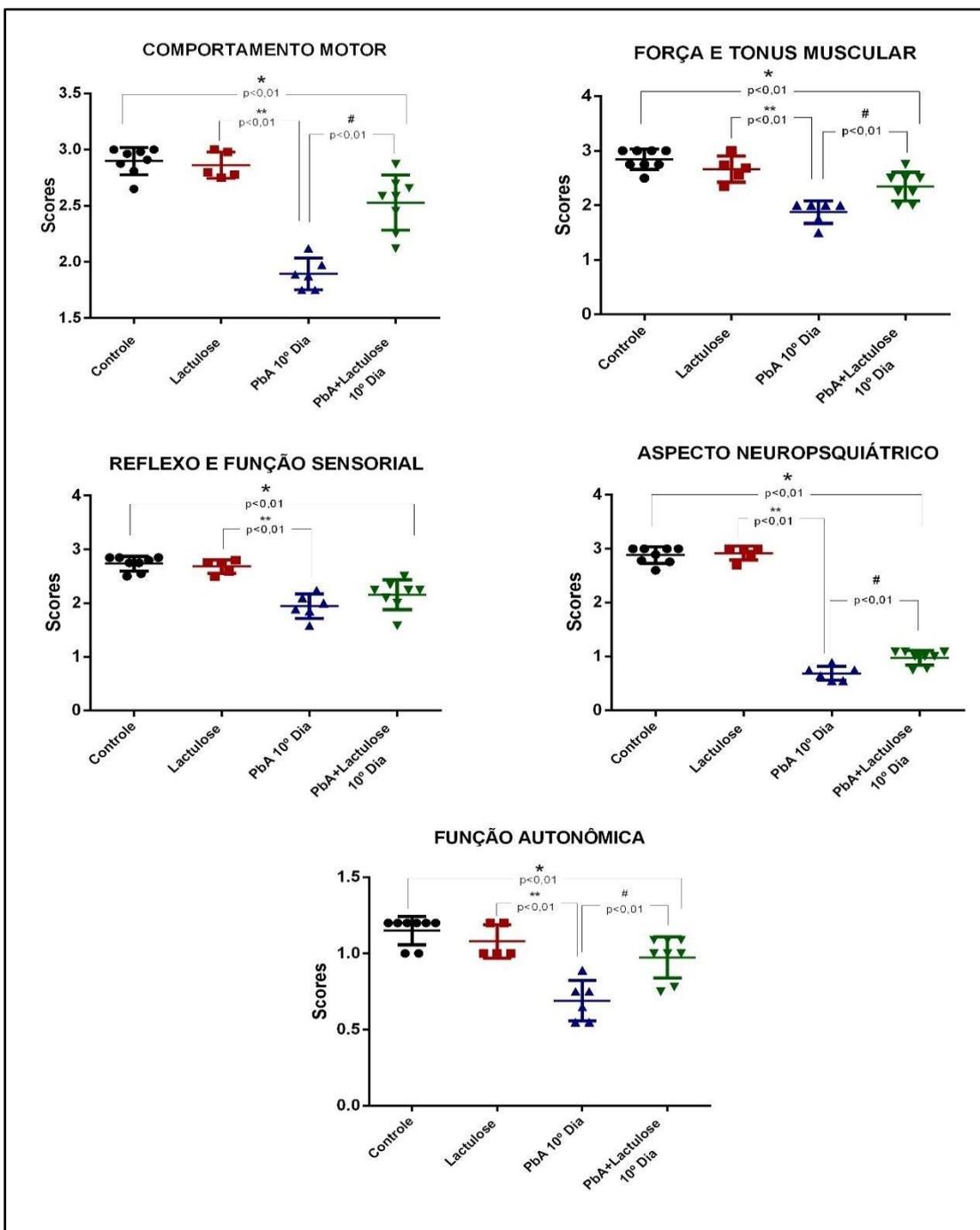


Figura 18: Tratamento com lactulose, atenua o comprometimento comportamental no 10º d.p.i, após inoculação da cepa PbA para indução do quadro de Malária. O comprometimento foi avaliado em cinco diferentes categorias funcionais: (A) comportamento motor, (B) força e tônus muscular, (C) reflexo e função sensorial, (D) estado neuropsiquiátrico e (E) função autonômica utilizando o protocolo SHIRPA. A soma dos escores de todas as categorias foi registrada como uma pontuação individual. Apresentando 4 grupos experimentais: controle, lactulose 3mg/kg, PbA e PbA+Lactulose 3mg/kg (n=8) e os dados estão expressos como média \pm SEM. ANOVA de uma via com pós teste não paramétrico de Wilcoxon. * $p < 0.01$ Controle vs PbA vs PbA+Lactulose 3mg/kg 10º d.p.i. ** Lactulose 3mg/kg vs PbA+Lactulose 10º d.p.i; # PbA vs PbA+Lactulose 10º d.p.i.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o modelo murino de malária não complicada, a acentuada alteração hepática gera um aumento nas concentrações de amônia no SNC, ocasionando um quadro característico de encefalopatia hepática. Nossos resultados apontam que o estabelecimento deste quadro desencadeia significativas alterações neurocomportamentais nos animais acometidos pela malária não complicada.

Estudos prévios demonstram que o desenvolvimento das alterações hepáticas, é comumente observada no quadro de malária não complicada, provocando diversos danos ao indivíduo (BECKER, et al., 2004). Ao avaliar a funcionalidade de órgãos e tecido em nosso modelo, encontramos alterações histopatológicas e bioquímicas significativas, confirmando que a perda da funcionalidade do fígado pode comprometer a homeostase de diversos sistemas, entre estes o sistema nervoso central, caracterizando o quadro de encefalopatia hepática. A encefalopatia hepática pode causar uma variedade de sintomas neurológicos, incluindo confusão, alterações de personalidade, dificuldade de concentração e, em casos graves, coma e óbito (BHALLA, SURI & SINGH, 2006; WHITTEN, et al 2011).

A descrição de alterações comportamentais tem se tornado cada vez mais frequente em indivíduos acometidos pela infecção por *Plasmodium vivax*, como demonstrado em um estudo desenvolvido com pacientes de origem indiana e africana que ao serem acometidos pela malária não complicada apresentaram danos cognitivos evidenciados na ressonância magnética (ABUAKU et al., 2019; MOHANTY et al., 2022). Esses dados sugerem que existe algum mecanismo subjacente que possa provocar danos neurológicos sem envolver a presença do parasita no SNC.

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizamos camundongos Balb-c inoculados com a cepa ANKA de *P. berghei* (PbA). Estudos prévios como de Van der Heyde et al (2001), demonstraram que camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA, são linhagens muito utilizadas para avaliar a malária não complicada, uma vez que apresentam as principais características associadas a doença, como a presença de sinais clínicos e o desenvolvimento de quadros como síndrome da angústia respiratória, nefrite e disfunção hepatocelular.

Antes de avaliarmos as alterações no tecido hepático, inicialmente, foi realizado a padronização do quadro de malária sistêmica nos camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA, por meio da análise de parâmetros como alterações de sinais clínicos, variação da massa corpórea, taxa de sobrevivência e parasitemia. Ao avaliarmos esses parâmetros, observamos semelhanças ao encontrado na literatura, o qual sugere que os camundongos Balb-c inoculados com a cepa PbA, apresentam uma infecção de caráter crônico, com progressão gradual, evoluindo à óbito entre o 20^o-30^o dia após a infecção (TANIGUCHI et al., 2015).

Em relação a porcentagem de parasitemia, observamos que os animais que foram inoculados com a cepa PbA, apresentaram um aumento na parasitemia entre os dias 3-29^o pós-infecção, sendo esta condição, uma característica esperada em decorrência da evolução da doença. Estudos de Gomes et al., (2015), mostraram que camundongos infectados com a cepa PbA, apresentam um aumento dos níveis de parasitemia em uma escala temporal, demonstrando que nossos dados estão condizentes com os achados da literatura.

Além da taxa de sobrevivência e parasitemia, também foi avaliado uma possível alteração no ganho ou perda de massa corpórea dos animais do grupo controle e infectado com a cepa PbA. Verificamos que houve uma perda da massa corpórea no decorrer dos dias pós-infecção, podendo estar associada aos sinais clínicos como ataxia e diminuição da busca pelo alimento que podem ser observados no decurso da infecção.

Taniguchi et al., (2015) e Sharma, Kaur & Shukla (2012), observaram em seus estudos uma variação da massa corpórea, que além de outras complicações, ocorreu em decorrência do quadro anêmico. Além da anemia durante a infecção, acredita-se que há um quadro anorexia e hipoglicemia que pode estar associado a desregulação da produção de glicose em decorrência da lesão hepática, culminando na perda de peso corporal (RAMOS et al., 2022).

Uma vez padronizado o quadro malária experimental nos camundongos Balb-c, buscamos caracterizar as alterações hepáticas dos animais infectados com a cepa PbA, no qual observamos a hepatoesplenomegalia, caracterizado pelo aumento do tamanho do fígado e baço e alterações histopatológicas como desorganização tecidual, hiperplasia das células de Kupffer com pigmento malárico, infiltrado de células mononucleares e alterações das transaminases

hepáticas ALT e AST, evidenciando o quadro de falência hepática. Tais achados corroboram com os resultados encontrados nos estudos de Deroost et al (2014) e Kauffmann et al, (2022), que demonstraram o desenvolvimento de uma hepatomegalia, bem como a ocorrência de icterícia, recrutamento de células mononucleares e elevação das enzimas hepáticas que podem ser observadas em diferentes níveis e estágios da doença.

Estudos como de Nigatu et al (2017), demonstram que a lesão do fígado afeta a integridade dos hepatócitos periportais e perivenoso, levando a liberação das transaminases ALT e AST na corrente sanguínea, sendo esses parâmetros utilizados como método diagnóstico de lesão e falência hepática.

Além da liberação das transaminases, estudo como de Thomsen et al., (2023), sugerem que a lesão hepática em decorrência de doenças como a doença hepática gordurosa não alcoólica provoca danos nos hepatócitos o que compromete o desenvolvimento do ciclo da ureia, deixando dessa forma a amônia circulante no sistema.

Após a confirmação da lesão hepática, buscamos entender se tais alterações poderiam ocasionar um comprometimento no sistema nervoso central, visto que estudos como de Vitor-Silva et al., (2009) e Vorasan et al., (2015), encontram alterações cognitivas, principalmente na aprendizagem e memória, de indivíduos diagnosticados com malária não complicada. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos associados a essas alterações.

Alguns estudos têm demonstrado que várias doenças infecciosas como síndrome da imunodeficiência adquirida, pneumonia, covid 19 e malária podem estar associadas a prejuízos cognitivos, principalmente no estabelecimento de memória (DESRUISSEAU et al., 2008). Além disso, quadros clínicos como ansiedade e depressão também estão sendo associado as infecções parasitárias (RODRIGUEZ-VALERO et al., 2020; REIS & CASTRO-FARIAS-NETO, 2022).

Nesse sentido, nossos dados demonstram um comprometimento neurológico, comportamental e histológico no córtex frontal dos camundongos infectados, evidenciando uma alteração significativa no comportamento motor em nosso modelo experimental. Dessa forma, em nosso modelo de malária não complicada descrevemos prejuízos comportamentais significativos nos animais, que provavelmente estão associados a outros mecanismos fisiopatológicos, uma vez que nosso modelo não apresenta a expressão das moléculas de adesão.

Além das alterações comportamentais, caracterizamos as alterações histológicas no córtex pré-frontal, evidenciando uma intensa área de desorganização tecidual, com a presença de infiltrados celulares, demonstrando que a infecção provoca danos teciduais, e que tais danos ficam mais exacerbados com a evolução da infecção, como demonstrado nos resultados analisados no 20º d.p.i.

Outro achado importante em nosso trabalho, foi evidenciado em nosso modelo murino de malária não complicada alterações no sistema nervoso central, compatíveis com danos cognitivos e comportamentais. Essas alterações iniciam a partir de uma lesão hepática, o qual o fígado não consegue realizar a metabolização de produtos tóxicos como a amônia, que conseqüentemente fica livre na circulação (RIDOLA et al., 2020).

Uma vez na circulação, a amônia chega até o sistema nervoso provocando um quadro de astrogliose e/ou edema citotóxico o qual observamos no 10º e 20º d.p.i. Os astrócitos se caracterizam por ser uma das células da glia mais abundante no SNC e apresentam diversas funções no tecido nervoso, incluindo metabolização de toxinas, manutenção metabólica e regulação da BHE (JÄKEL & DIMOU, 2017).

Estudo como o de Nasuhidehnavi & Yap (2021), já demonstram que as doenças neurológicas que estão associadas à neuroinflamação têm etiologia autoimune, neurodegenerativa ou infecciosa como no caso da toxoplasmose e malária, o qual foi encontrado uma astrogliose, exacerbação da resposta inflamatória, aumento das espécies reativas e quebra da BHE.

Já se sabe que a formação de edema cerebral e a ruptura da barreira hematoencefálica, são os principais achados no quadro de malária cerebral (ATAÍDE et al 2020), contudo, pouco estudos buscam elucidar se tais alterações podem estar presentes na infecção em modelo murino de malária não complicada.

Níveis elevados de amônia no SNC podem culminar em quebra da barreira hematoencefálica, ocasionando complicações neuropatológicas, alterações de cognição, capacidade locomotora diminuída e rebaixamento do nível de consciência. Quando acumulada no SN a amônia é capaz de aumentar o estresse oxidativo, levando ao aumento das citocinas pró-inflamatórias e alteração do

metabolismo dos neurotransmissores como GABA e glutamato, prejudicando assim o funcionamento do SN (THOMSEN et al., 2023).

Lacerda-Queiroz et al. (2010) e Sousa et al (2018), demonstraram em seus estudos que a disfunção de memória em modelo murino de malária está correlacionada com aumento da resposta inflamatória e hemorragia cerebral. No presente estudo, o modelo murino de malária não complicada, desenvolveu uma série de alterações neurológicas, além de ativação microglial evidenciada durante o estudo histopatológico, que foram aparecendo durante a infecção e que possivelmente estão associados com as alterações inflamatórias no SNC.

A resposta inflamatória é produzida principalmente por células como a micróglia e astrócitos, que podem provocar o aumento de citocinas, espécies reativas de oxigênio, dentre outras substâncias (GUHA et al., 2014; BRASIL et al., 2017). Estudos como de Reis e Castro-Faria-Neto (2021) e de Lansink, et al (2023), elucidaram que a resposta inflamatória no SNC, é uma das principais características decorrentes do quadro de encefalopatia hepática, sendo associada as diversas doenças infecciosas.

Nesse sentido, buscamos avaliar a participação da resposta inflamatória em nosso estudo. Dessa forma, avaliamos primeiramente a participação da microglia que são as primeiras a responder ao processo inflamatório resultante da infecção por malária. A ativação microglial já foi demonstrada em cérebros post-mortem de pacientes com MC e em malária cerebral experimental (MCE) (LIMA et al., 2021).

Nossos resultados demonstraram por meio da técnica de imunofluorescência uma marcação positiva para Iba-1 no 10^o e 20^o d.p.i., evidenciando o papel ativo da microglia frente ao processo de infecção em nosso modelo murino de malária não complicada. Associando a essa ativação microglia, buscamos quantificar os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- no plasma e córtex dos animais no 10^o e 20^o d.p.i, e encontramos um aumento significativo, confirmando que o quadro de EH quando instalado, induz aumento dos níveis de amônia que culmina para uma intensa resposta inflamatória. Tais achados podem modular o metabolismo dos neurotransmissores e levar a mecanismos neurotóxicos (BARBOSA-SILVA et al., 2021).

Doenças parasitárias, provocam o aumento do processo inflamatório sistêmico, resultando em neuroinflamação, com ativação das células gliais e

aumento dos níveis de citocinas pró inflamatórias, disfunção da barreira hematoencefálica, alterações no metabolismo dos neurotransmissores e neurotoxicidade, acontecendo frequentemente no curso tardio da doença (BARBOSA-SILVA et al., 2021).

O processo inflamatório exacerbado pode desempenhar um papel significativo nas alterações encontradas no SNC, isso ocorre em resposta a um processo infeccioso, como é o caso da infecção por *Plasmodium* (WILSON et al., 2016). Durante a infecção, o organismo responde desencadeando uma resposta inflamatória para tentar combater a infecção. No entanto, em algumas situações, essa resposta pode ser tornar exacerbada, levando a danos nos tecidos, incluído o tecido cerebral, podendo resultar em dano neuronal, aumento das citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e quebra da barreira hematoencefálica (DUNST, KAMENA MATUSCHEWSKI, 2017; POPA & POPA, 2021).

Nosso trabalho também demonstrou aumento significativo do tônus GABAérgico, o que também pode contribuir para as alterações neurológicas observadas no presente estudo. De acordo com Ochoa-Sanchez & Rosa (2018) e Butterworth (2019) o GABA desempenha um papel crucial na regulação da excitabilidade neuronal e com o quadro da disfunção hepática, ocorre o aumento dos seus níveis, no qual acredita-se que seja uma resposta compensatória do cérebro à neurotoxicidade da amônia. O GABA exerce efeitos inibitórios nos neurônios, reduzindo a excitabilidade neuronal e regulando a transmissão sináptica. Um aumento do tônus GABAérgico pode ser uma tentativa do cérebro de proteger-se contra a hiperexcitabilidade neuronal e os danos associados à neurotoxicidade da amônia (ARJUNAN et al., 2022).

Uma das principais alterações encontradas na EH, ocorre em decorrência do aumento dos níveis de amônia na corrente sanguínea e, conseqüentemente, no cérebro, o qual foi observada no presente estudo. Nossos resultados, demonstram pela primeira vez o aumento precoce dos níveis de amônia no cérebro dos animais infectados no 10^o d.p.i., e ao comparar com os achados comportamentais, podemos observar um comprometimento neurológico expressivo, incluindo alterações funções motoras e cognitiva.

Esses achados comprovam que o quadro de malária não complicada quando estabelecido e não tratado da forma adequada, culmina para a falência

hepática, podendo prejudicar metabolismo da amônia, que atravessa a BHE provocando danos no sistema nervoso central (ZHU et al., 2023).

Em condições normais, a amônia não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. No entanto, em casos de encefalopatia hepática e disfunção hepática grave, os níveis elevados de amônia no sangue sobrecarregam os mecanismos de excreção, o que facilita seu depósito no SNC, desencadeando uma série de efeitos, incluindo neuroinflamação, disfunção do sistema de neurotransmissão e morte celular (MOHIUDDIN & KHATTAR, 2023).

Estudo como de Wit et al., (2020), utilizaram a lactulose como uma alternativa para melhorar ou atenuar o quadro neurológico de paciente cirróticos ou com quadro de encefalopatia hepática. Após o presente trabalho evidenciar danos neurológicos acompanhado com aumento de amônia no cérebro no modelo murino de malária não complicada, utilizamos a lactulose como alternativa para remover a amônia do sistema, confirmando dessa forma a participação da amônia nos achados neurológicos presentes neste estudo.

A utilização da lactulose resultou em uma atenuação dos danos comportamentais conforme observado em nossos resultados, demonstrando que a amônia quando não metabolizada pelo fígado provocava um quadro de encefalopatia hepática, culminando em vários danos neurológicos em nosso modelo murino de malária não complicada.

O presente trabalho fornece evidências de que o mecanismo fisiopatológico envolvido nas alterações do sistema nervoso central em modelo murino de malária não complicada, ocorre em decorrência do quadro de falência hepática, que por sua vez não conseguem realizar o metabolismo da amônia, e conseqüentemente chega ao SNC, ocasionando os danos neurológicos observados no presente estudo. Dentre as alterações encontradas, podemos destacar o aumento dos níveis de amônia sérica e cerebral, edema cerebral e aumento da resposta inflamatória, o qual podem justificar os achados neurológicos e comportamentais encontrados no presente trabalho.

Elucidamos que o quadro da malária não complicada pode ter danos hepáticos significativos, resultando em disfunção hepática e subseqüentemente, encefalopatia hepática, o que normalmente é ocasionado pela destruição do parênquima hepático, levando a liberação de toxinas e o acúmulo de amônia. Além disso, identificamos que a neuroinflamação desempenha um papel crucial

na progressão da encefalopatia hepática na malária, comprometendo a integridade da barreira hematoencefálica e desencadeando uma cascata de eventos que culminam em disfunção cerebral. Nesse contexto, também identificamos que ao depletar amônia do sistema, utilizando a lactulose como terapia alvo, conseguimos atenuar os danos neurológicos da encefalopatia hepática.

Contudo, nossos achados refletem a necessidade de mais estudos acerca do envolvimento hepático na malária não complicada, visto que muitas vias podem estar envolvidas no processo de lesão neurológica, bem como sugerir novos tratamentos coadjuvantes que possam minimizar tais danos.

7 CONCLUSÃO

- A infecção com a cepa PbA em camundongos da linhagem Balb-c desenvolve um quadro clássico de hepatopatia, culminando em hepatoesplenomegalia e alterações nas funções hepática, além de provocar uma intensa desorganização tecidual com a presença de infiltrado inflamatório, deposição do pigmento malárico e hiperplasia das células de Kupffer.
- Após caracterizar a lesão hepática, evidenciou-se uma série de alterações no sistema nervoso central, que envolve complicações neurocomportamentais e cognitivas, desencadeada pelo quadro da encefalopatia hepática.
- A presença de edema cerebral e quebra da barreira hematoencefálica no 20º d.p.i., estão relacionados com os achados neurológicos.
- Uma vez caracterizado as alterações neurocomportamentais, os resultados demonstram um aumento do tônus GABAérgico acompanhado de uma diminuição da liberação do glutamato, o que pode ser justificado pelo aumento dos níveis de amônia no sistema nervoso.
- A avaliação da resposta inflamatória apresentou uma marcação positiva para Iba-1, associado ao aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no cérebro e plasma de camundongos após a inoculação com a cepa PbA no 10º e 20º dia pós infecção, demonstrando a participação do processo inflamatório no quadro de malária não complicada.
- Para caracterizar uma possível via do processo fisiopatológico envolvendo a infecção pelo *Plasmodium*, lesão hepática e alterações no sistema nervoso central, quantificamos os níveis de amônia no cérebro dos camundongos Balb-c após inoculação com a cepa PbA no 10º dia pós infecção e observamos um aumento significativo, levando ao quadro de encefalopatia hepática.
- Para avaliar a atenuação dos danos neurocomportamentais, foi realizado o sequestro da amônia utilizando a lactulose na dose 3mg/kg, o qual conseguiu

postergar a curva de sobrevivência dos animais infectados, além de melhorar o quadro cognitivo e comportamental.

- Este estudo destaca a importância da vigilância do quadro de malária não complicada, visto que pode evoluir para a encefalopatia hepática e provocar danos ao sistema nervoso central. Uma compreensão aprofundada dos mecanismos subjacentes a infecção e estratégias terapêuticas disponíveis é de suma importância para melhorar o manejo e os resultados clínicos dessa condição.

5 REFERÊNCIAS

ABUGA, K.M., JONES-WARNER, W., HAFALLA, J.C.R. Immune responses to malaria pre-erythrocytic stages: Implications for vaccine development. **Parasite Immunol.** 2021 Feb 1; 43(2): e12795.

ABUAKU, B., DUAH-QUASHIE, N.O., QUAYE, L., MATREVI, S.A., QUASHIE, N., GYASI, A., OWUSU-ANTWI, F., MALM, K., KORAM, K. Therapeutic efficacy of artesunate-amodiaquine and artemether-lumefantrine combinations for uncomplicated malaria in 10 sentinel sites across Ghana: 2015-2017. **Malar J.** 2019 Jun 24;18(1):206.

ADDAI-MENSAH, O., ANNANI-AKOLLOR, M.E., FONDJO, L.A., ANTO, E.O., GYAMFI, D., SALLAH, L., AGAMA, D., DJABATEY, R., OWIREDU, E.W. High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Potential Ancillary Biomarker for Malaria Diagnosis and Morbidity. **Dis Markers.** 2019 Apr 4; 2019:1408031.

AIDER, M., & GIMENEZVIDAL, M. Lactulose synthesis by electro-isomerization of lactose: Effect of lactose concentration and electric current density. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 163–170. 10.1016/j.ifset.2012.05.007.

ARJUNAN, A., SAH, D.K., JUNG, Y.D., SONG, J. Hepatic Encephalopathy and Melatonin. **Antioxidants** (Basel). 2022 Apr 25;11(5):837.

ASHLEY, E.A., PHYO, A.P. In the Americas or *Plasmodium vivax* are the two main causative agents of malaria. **Drugs.** 2018; 78(9): 861-879.

ATAIDE, B.J.A., KAUFFMANN, N., MENDES, N.S.F., TORRES, M.L.M., DOS ANJOS, L.M., PASSOS, A.D.C.F., DE MORAES, S.A.S, BATISTA, E.J.O., HERCULANO, A.M., OLIVEIRA, K.R.H.M. Melatonin Prevents Brain Damage and Neurocognitive Impairment Induced by *Plasmodium Berghei* ANKA Infection in Murine Model of Cerebral Malaria. **Front Cell Infect Microbiol.** 2020 Sep 30;10:541624.

BABIKER, H.A., GADALLA, A.A.H., RANDORD-CARTWRIGHT, L.C. The role of asymptomatic *P. falciparum* parasitaemia in the evolution of antimalarial drug resistance in areas of seasonal transmission. **Drug Resist Updat.** Feb-Apr 2013;16(1-2):1-9.

BANFI, G., COLOMBINI, A., LOMBARDI, G., LUBKOWSKA, A. Metabolic markers in sports medicine. **Adv Clin Chem.** 2012; 56:1-54.

BHALLA, A., SURI, V., SINGH, V. Malarial hepatopathy. **J Postgrad Med.** 2006 Oct-Dec;52(4):315-20.

BECHTSI, D.P., WATERS, A.P. Genomics and epigenetics of sexual commitment in *Plasmodium*. **Int J Parasitol.** 2017 Jun;47(7):425-434.

BECKER, K. TILLEY, L. VENNERSTROM, J.L. ROBERTS, D. ROGERSON, S. GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology.**2004;34(2):163–189.

BUTTERWORTH, R.F. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. **Drugs.** 2019 Feb;79(Suppl 1):17-21.

BARBOSA-SILVA, M.C., LIMA, M.N., BATTAGLINI, D., ROBBA, C., PELOSI, P., ROCCO, P.R.M., MARON-GUTIERREZ, T. Infectious disease-associated encephalopathies. **Crit Care.** 2021; 25: 236.

BRASIL, L.M.B.F., VIEIRA, J.L.F., ARAÚJO, E.C., PIANI, P.P.F., DIAS, R.M., VENTURA, A.M.R.S., Cognitive performance of children living in endemic areas for *Plasmodium vivax*. **Malar J.** 2017; 16:370.

CERIOTTI, F. HENNY, J. QUERALTÓ, J. ZIYU, S. OZARDA. Y. CHEN. B. BOYD, J. C. PANTEGHINI. M. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** 48,1593–1601. 2010.

COX, F.E.G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors.** 2010.

CHAKRAVARTY, A., GHOSH, B., BHATTACHARYYA, R., SENGUPTA, S., MUKHERJEE, S. Acute inflammatory demyelinating polyneuropathy following *plasmodium vivax* malaria. **Neurol India.** 2004 Mar;52(1):130-1.

CROSSINGHAM, J.L. JENKINSON, J. WOOLRIDGE, N. GALLINGER, S. TAIT, G.A. MOULTON, C.A.E. Interpreting three-dimensional structures from two-dimensional images: web based interactive 3D teaching model of surgical liver anatomy. **HPB – International hepato-pacreato** (Oxford). 2009 Sep; 11(6): 523–528.

DANYANAND, K.K., ACHUR, R.N., GOWDA, D.C. Epidemiology, Drug Resistance, and Pathophysiology of *Plasmodium vivax* Malaria. **J Vector Borne Dis.** 2018 Jan-Mar; 55(1): 1–8.

DASARATHY, S., MOOKERJEE, R.P., RACKAYOVA, V., THRANE, V.R., VAIRAPPAN, B., OTT, P., ROSE, C.F. Ammonia toxicity: from head to toe? **Metab Brain Dis.** 2017 Apr;32(2):529-538.

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.

DE WIT, K., SCHAAPMAN, J.J., NEVENS, F., VERBEEK, J., COENEN, S., CUPERUS, F.J.C., KRAMER, M., TJWA, E.T.T.L., MOSTAFAVI, N., DIJKGRAAF, M.G.W., VAN DELDEN, O.M., BEUERS, U.H.W., COENRAAD, M.J., TAKKENBERG, R.B. Prevention of hepatic encephalopathy by administration of rifaximin and lactulose in patients with liver cirrhosis undergoing placement of a transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): a multicentre randomised, double blind, placebo controlled trial (PEARL trial). **BMJ Open Gastroenterol.** 2020 Dec;7(1):e000531.

DEGHAN, H., OSHAGHI, M.A., MOSA-KAZEMI, S.H., ABAI, M.R., RAFIE, F., NATEGHPOUR, M., MOHAMMADZADEH, H. **Experimental** Study on *Plasmodium berghei*, *Anopheles Stephensi*, and BALB/c Mouse System: Implications for Malaria Transmission Blocking Assays. **Iran J Parasitol.** 2018 Oct-Dec;13(4):549-559.

DENNIS, C.V., SHEAHAN, P.J., GRAEBER, M.B., SHEEDY, D.L., KRIL, J.J., SUTHERLAND, G.T. Microglial proliferation in the brain of chronic alcoholics with hepatic encephalopathy. **Metab Brain Dis.** 2014 Dec;29(4):1027-39

DEROOST, K. LAYS, N. PHAM, T. BACI, D. EYNDE, K. V. D. KOMUTA, M. PRATO, M. ROSKAMS, T. SCHWARZER, E. OPDENAKKER, G. STEEN, P. E. V. D. Hemozoin Induces Hepatic Inflammation in Mice and Is Differentially Associated with Liver Pathology Depending on the *Plasmodium* Strain **PLoS One.** 9(11). 2014.

DESRUISSEAU, M.S., GULINELLO, M., SMITH, D.N., LEE, S.C., TSUJI, M., WEISS, L.M., SPRAY, D.C., TANOWITZ, H.B. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. **J Infect Dis.** 2008 Jun 1;197(11):1621-7.

DING, K., XU, J., WANG, H., ZHANG, L., WU, Y., LI, T. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. **Neurochem Int.** 2015 Dec;91:46-54.

DUNST, J., KAMENA, F., MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol.** 2017 Jul 20;7:324.

FORTINI, I., AROUCA, E.M.G., TENGAM, F.M., NITRINI, R. Chronic HCV infection and neuropsychiatric dysfunction. **eNeurologicalSci.** 2019 Dec; 17: 100206.

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine.** 30.93–129.2010.

GRIFFING, S.M., TAUIL, P.L., UDHAYAKUMAR, V., SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015 Sep; 110(6): 701–718.

GRIGG, M.J., SNOUNOU, G. Plasmodium simium: a Brazilian focus of anthrozoonotic vivax malaria?. **Lancet Glob Health** 2017 Oct; 5(10):e961-e962.

GUHA, S.K., TILLU, R., SOOD, A., PATGAONKAR, M., NANAVATY, I.N., SENGUPTA, A. Single episode of mild murine malaria induces neuroinflammation, alters microglial profile, impairs adult neurogenesis, and causes deficits in social and anxiety-like behavior. **Brain Behav Immun.** 2014; 42:123–137.

HERTZ, L., KALA, G. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. **Metab Brain Dis.** 2007 Dec;22(3-4):199-218.

HIGARZA, S.G., ARBOLEYA, S., GUEIMONDE, M., GÓMEZ-LÁZARO, E., ARIAS, J.L., ARIAS, N. Neurobehavioral dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis is associated with hyperammonemia, gut dysbiosis, and metabolic and functional brain regional deficits. **PLoS One.** 2019 Sep 20;14(9):e0223019.

HUDSON, M., SCHUCHMANN, M. Long-term management of hepatic encephalopathy with lactulose and/or rifaximin: a review of the evidence. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** 2019 Apr; 31(4): 434–450.

JÄKEL, S., DIMOU, L. Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. **Front Cell Neurosci.** 2017 FEB 13;11:24.

JAIN, A., KAUSHIK, R., KAUSHIK, R.M. Malarial hepatopathy: Clinical profile and association with other malarial complications. **Acta Trop** 2016 Jul; 159:95-105.

JAYAKUMAR, A.R., NOREMBERG, M.D. Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. **J Clin Exp Hepatol**. 2018 Sep;8(3):272-280.

KAUFFMANN, N., PENHA, L.K.R.L da., BRAGA, D.V., ATAÍDE, B.J.A., MENDES, N.S.F., SOUSA, L.P.De., SOUZA, G.S.Da, PASSOS, A.C.F., BATISTA, E.J.O., HERCULANO, A.M., OLIVEIRA, K.R.M. Differential Effect of Antioxidants Glutathione and Vitamin C on the Hepatic Injuries Induced by *Plasmodium berghei* ANKA Infection. **Biomed Res Int**. 2021 Sep 4;2021:9694508.

KIM, H.J., KIM, S.Y., SHIN, S.P., YANG, Y.J., BANG, C.S., BAIK, G.H., KIM, D.J., HAM, Y.L., CHOI, E.Y., SUK, K.T. Immunological measurement of aspartate/alanine aminotransferase in predicting liver fibrosis and inflammation. **Korean J Intern Med**. 2020 Mar; 35(2): 320–330.

KORI, L.D., VALECHA, N., ANVIKAR, A.R. Insights into the early liver stage biology of *Plasmodium*. **J Vector Borne Dis**. Jan-Mar 2018;55(1):9-13.

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. **Exp Parasitol**. 2010 Jul;125(3):271-8.

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

LIMA, M.N., FREITAS, R.J.R.X., PASSOS, B.A.B.R., DARZE, A.M.G., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., MARON-GUTIERREZ, T. Neurovascular Interactions in Malaria. **Neuroimmunomodulation**. 2021;28:108–117

LANSINK, L.I.M., SKINNER, O.P., ENGEL, J.A., LEE, H.J., SOON, M.S.F., WILLIAMS, C.G., SHEELANAI, A., PERNOLD, C.P.S., LAOHAMONTHONKUL, P., AKTER, J., STOLL, T., HILL, M.M., TALMAN, A.M., RUSSELL, A., LAWNICZAK, M., JIA, X., CHUA, B., ANDERSON, D., CREEK, D.J., DAVENPORT, M.P., KHOURY, D.S., HAQUE, A. Systemic host inflammation induces stage-specific transcriptomic modification and slower maturation in malaria parasites. **mBio**. 2023 Aug 31;14(4):e0112923.

LIMÓN, I.D., ANGULO-CRUZ, I., SÁNCHEZ-ABDON, L., PRATICIO-MARTÍNEZ, A. Disturbance of the Glutamate-Glutamine Cycle, Secondary to Hepatic Damage, Compromises Memory Function. **Front. Neurosci**, 27 January 2021.

LIU, J., LKHAGVA, E., CHUNG, H.J., KIM, H.J., HONG, S.T. The Pharmabiotic Approach to Treat Hyperammonemia. **Nutrients**. 2018 Feb; 10(2): 140.

LONGLEY, R.J., HILL, A.V.S., SPENCER, A.J. Malaria vaccines: identifying Plasmodium falciparum liver-stage targets. **Frontiers in Microbiology**. 6: 965. 2015.

MACE, K.E., LUCCHI, N.W., TAN, K.R. Malaria Surveillance — United States, 2018. **MMWR Surveill Summ**. 2022 Sep 2; 71(8): 1–35.

MARTINS, Y.C., WERNECK, G.L., CARVALHO, L.J., SILVA, B.P., ANDRADE, B.G., SOUZA, T.M., SOUZA, D.O., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. **Malar J**. 2010 Mar 24;9:85.

MATLANI, M., KOJOM, L.P., MISHRA, N., DOGRA, V., SINGH, V. Severe vivax malaria trends in the last two years: a study from a tertiary care centre, Delhi, India. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2020; 19: 49.

MEDANA, I.M., HUNT, N.H., CHAUDHRI, G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **Am J Pathol**. 1997 Apr;150(4):1473-86.

MILNER, D.A.Jr. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2018 Jan 2;8 (1):a025569.

MOHANTY, S., SAHU, P.K., PATTNAIK, R., MAJHI, M., MAHARANA, S., BAGE, J., MOHANTY, A., MOHANTY, A., BENDSZUS, M., PATTERSON, C., GUPTA, H., DONDORP, A.M., PIRPAMER, L., HOFFMANN, A., WASSMER, S.C. Evidence of Brain Alterations in Noncerebral Falciparum Malaria. **Clin Infect Dis**. 2022 Jul 1; 75(1): 11–18.

MOHIUDDIN, S.S., KHATTAR, D. Biochemistry, Ammonia. **StatPearls [Internet]**. 2023 Feb 20.

MOLINA-FRANKY, J., CUY-CHAPARRO, L., CAMARGO, A., REYES, C., GÓMEZ, M., SALAMANCA, D.R., PATARROYO, M.A., PATARROYO, M.E. *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stage vaccine development. **Malar J**. 2020; 19: 56.

MOORE, B.R. Liver injury in uncomplicated malaria: an overlooked phenomenon. **EBioMedicine**. 2018 Nov; 37:15-16.

MORAES, E.R.Da S., GRISOLIA, A.B.A., OLIVEIRA, K.R.M., PICANÇO-DINIZ, D.L.W., CRESPO-LÓPEZ, M.E., MAXIMINO, C., BATISTA, E.De J.O.,

HERCULANO, A.M. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **Journal of Chromatography B**. Volume 907, 15 October 2012, Pages 1-6.

MU, M., ZUO, S., WU, R-M., DENG, K-S., LU, S., ZHU, J-J., ZOU, G-L., YANG, J., CHENG, M-L., ZHAO, X-K. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway. **Drug Des Devel Ther**. 2018; 12: 4107–4115.

MULLER, S. Role and Regulation of Glutathione Metabolism in *Plasmodium falciparum*. **Molecules**, 20, 10511-10534. 2015.

NAKADATE, K., KAMATA, S. Severe Acute Hepatic Dysfunction Induced by Ammonium Acetate Treatment Results in Choroid Plexus Swelling and Ventricle Enlargement in the Brain. **Int J Mol Sci**. 2022 Feb 11;23(4):2010.

NASUHIDEHNAVI, A., YAP, G.S. Microglia and astrocyte responses to neuropathogenic protozoan parasites. **Fac Rev**. 2021 Sep 3;10:69.

NIGATU T., AFEWORK M., URGU K., ERGETE W., MAKONNEN E. Toxicological investigation of acute and chronic treatment with *Gnidia stenophylla* Gilg root extract on some blood parameters and histopathology of spleen, liver and kidney in mice. **BMC Research Notes**. 2017;10(1): p. 625.

NIU, F., CHONG, S., QIN, M., LI, S., WEI, R., ZHAO, Y. Mechanism of Fibrosis Induced by *Echinococcus* spp. **Diseases**. 2019 Sep; 7(3): 51.

NG, O.T., OOI, E.E. LEE, C.C. LEE, P.J. NG, L.C. PEI, S.W. et al. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**. 14(5):814-6. 2008.

OCHOA-SANCHEZ, R., ROSE, C.F. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease. **J Clin Exp Hepatol**. 2018 Sep;8(3):262-271.

OEDRA, A., WEBB, L., MARQUART, L., BRITTON, L.J., CHALON, S., MOEHRLE, L.J., ANSTEY, N.M., WILLIAM, T., GRIGG, M.J., LALLOO, D.G., BARBER, B.E., McCARTHY, J.S. Liver Function Test Abnormalities in Experimental and Clinical *Plasmodium vivax* Infection. **Am J Trop Med Hyg**. 2020 Nov; 103(5): 1910–1917.

OLIVEIRA, K.R.H.M., KAUFFMANN, N., LEÃO, L.K.R., PASSOS, A.C.F., ROCHA, F.A.F., HERCULANO, A.M., NASCIMENTOS, J.L.M do. Cerebral malaria induces electrophysiological and neurochemical impairment in mice retinal tissue: possible effect on glutathione and glutamatergic system. **Malar J**. 2017 Nov 2;16(1):440.

PANESAR, P. S., KUMARI, S. Lactulose: Production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**. 29, 940–948. 10.1016/j.biotechadv.2011.08.008.

PELKONEN, T., ALBINO, A., ROINE, I., BERNADINHO, L., PELTOLA, H. C-reactive protein in children with malaria in Luanda, Angola: a prospective study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2015 Aug;109(8):535-7.

POPA, G.L., POPA, M.I. Recent Advances in Understanding the Inflammatory Response in Malaria: A Review of the Dual Role of Cytokines. **J Immunol Res**. 2021 Nov 8;2021:7785180.

PRADEL, G. & FREVERT, U. Plasmodium sporozoites actively enter and pass through Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. **Hepatology** 33(5):1154–1165. 2001.

RACKAYOVA, V., BRAISSANT, O., ROUGEMONT, A.L., CUDALBU, C., MCLIN, V.A. Longitudinal osmotic and neurometabolic changes in young rats with chronic cholestatic liver disease. **Sci Rep**. 2020 May 5;10(1):7536.

RAMOS, S., ADEMOLUE, T.W., JENTHO, E., WU, Q., GUERRA, J., MARTINS, R., PIRES, G., WEIS, S., CARLOS, A.R., MAHÚ, I., SEIXAS, E., DUARTE, D., RAJAS, F., CARDOSO, S., SOUSA, A.G.G., LILUE, J., PAIXÃO, T., MITHIEUX, G., NOGUEIRA, F., SOARES, M.P. A hypometabolic defense strategy against malaria. **Cell Metab**. 2022 Aug 2;34(8):1183-1200.e12.

RECUENCO, F.C., TAKANO, R., CHIBA, S., SUGI, T., TAKEMAE, H., MURAKOSHI, F., ISHIWA, A., INOMATA, A., HORIMOTO, T., KOBAYASHI, Y., HORIUCHI, N., KATO, K. Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by Plasmodium berghei ANKA in BALB/c mice. **Malar J**. 2014 Dec 11;13:487.

REIS, P.A., CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Systemic Response to Infection Induces Long-Term Cognitive Decline: Neuroinflammation and Oxidative Stress as Therapeutic Targets. **Front. Neurosci**. 17 February 2022.

RIDOLA, L., FACCIOLI, J., NARDELLI, S., GIOIA, S., RIGGIO, O. Hepatic Encephalopathy: Diagnosis and Management. **J Transl Int Med**. 2020 Dec 31;8(4):210-219.

RODRIGUEZ-VALERO, N., VERA, I., TORRALVO, M.R., DE ALBA, T., FERRER, E., CAMPRUBI, D., ALMUEDO, R.A., GALLEGGO, R.S, MUELAS, M., PINAZO,

- M.J., MUÑOZ, J. Malaria prophylaxis approach during COVID-19 pandemic. **Travel Med Infect Dis.** 2020 Nov-Dec;38:101716.
- ROSA-GONÇALVES, P., SOUSA, L.P.DE., MAIA, A.B., RIBEIRO-GOMES, F.L., GRESS, C.C.T.DE.L., WERNECK, G.L., SOUZA, D.O., ALMEIDA, R.F., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Dynamics and immunomodulation of cognitive deficits and behavioral changes in non-severe experimental malária. **Front Immunol.** 2022; 13: 1021211.
- ROSSATI, A., BARGIACCHI, O., KROUMOVA, V., ZARAMELLA, M., CAPUTO, A., GARAVELLI, P.L. Climate, environment and transmission of malaria. **Infez Med.** 2016 Jun 1;24(2):93-104.
- ROUGERON, V., DARON, J., FONTAINE, M.C., PRUGNOLLE, F. Evolutionary history of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium simium* in the Americas. **Malar J.** 2022; 21: 141.
- SATO, S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **J Physiol Anthropol.** 2021; 40: 1.
- SATO, Y., RIES, S., STENZEL, W., FILLATREAU, S., MATUSCHEWSKI, K. The Liver-Stage *Plasmodium* Infection Is a Critical Checkpoint for Development of Experimental Cerebral Malaria. **Front Immunol.** 2019; 10: 2554.
- SCACCABAROZZI, D., DEROOST, K., CORBETT, Y., LAYS, N., CORSETTO, P., SALÈ, F.O., STEEN, P.E.V.D., TARAMELLI, D. Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with *Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. **Malar J.** 2018; 17: 18.
- 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 Infect.** 2011 Sep;13(10):828-36.
- SCHINDLER, T., ROBAINA, T., SAX, J., BIERI, J.R., MPINA, M., GONDWE, L., ACUCHE, L., GARCIA, G., CORTES, C., MAAS, C., DAUBENBERGER, C. Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea. **Malar J.** 2019; 18: 9.
- SHARMA, L., KAUR, J., SHUKLA, G. Role of oxidative stress and apoptosis in the placental pathology of *Plasmodium berghei* infected mice. **PLoS One.** 2012;7(3):e32694.

SOUSA, L.P. De.; ALMEIDA, R.F.De., RIBEIRO-GOMES, F.L., CARVALHO, L.J.De.M., MELLO-SOUZA, T., SOUZA, D.O.G.De., SOUZA, G.De., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Long-term effect of uncomplicated *Plasmodium berghei* ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. **Parasit Vectors**. 2018; 11: 191.

TANIGUCHI, T., MIYAUCHI, E., NAKAMURA, S., HIRAI, M., SUZUE, K., IMAI, T., NOMURA, T., HANDA, T., OKADA, H., SHIMOKAWA, C., ONISHI, R., OLIA, A., HIRATA, J., TOMITA, H., OHNO, H., HORII, T., HISAEDA, H. Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Sci Rep**. 2015 Oct 27; 5:15699.

TAVARES, J., FORMAGLIO, P., THIBERGE, S., MORDELET, E., ROOIJEN, N. V., MEDVINSKY, A., MÉNARD, R., AMINO, R. Role of host cell crossing the sporozoite malaria during liver infection. **Journal Experimental Medicine**. 210 (5): 905-915. 2013.

TAYLOR, W.R.J., HANSON, J., TURNER, G.D.H., WHITE, N.J., DONDORP, A.M. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**. 2012 Aug;142(2):492-505.

TIMOUMI, R., AMARA, I., NEFFATI, F., NAJJAR, M.F., GOLLI-BENNOUR, E.E., BACHA, H., ABID-ESSEFI, S. Acute triflumuron exposure induces oxidative stress responses in liver and kidney of Balb/C mice. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2019 Feb;26(4):3723-3730.

THOMSEN, K.L, ERIKSEN, P.L., KERBERT, A.J., DE CHIARA, F., JALAN, R., VILSTRUP, H. Role of ammonia in NAFLD: **An unusual suspect**. 2023 Apr 25;5(7):100780.

TUTEJA, R. Malaria – The global disease. **The FEBS Journal**. 274 (2007).

TRITTEN, L., KEISER, J., KARWA, T., UTZINGER, J., HOLMES, E., SARIC, J. Comparing systemic metabolic responses in mice to single or dual infection with *Plasmodium berghei* and *Heligmosomoides bakeri*. **Mol BioSyst**. 2014;10(9):2358–2367.

TRIVEDI, S., CHAKRAVARTY, A. Neurological Complications of Malaria. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 2022 Aug;22(8):499-513.

VAN DER HEYDE, H. C., BAUER. P., SUN. G., CHANG. W.L., YIN. L., FUSELER. J., GRANGER. D. N. Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a radiolabeled monoclonal antibody technique. **Infection Immunity**. 69(5):3460-5. 2001.

VANDERBERG, J. P., FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilization of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **International Journal of Parasitology**. 34 991–996. 2004.

VIRIYAVEJAKUL, P., KHACHONSAKSUMET, V., PUNSAWAD, C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor kappa B expression. **Malar J**. 2014;**13**:106. doi: 10.1186/1475-2875-13-106.

VITOR-SILVA, S., REYES-LECCA, R.C., PINHEIRO, T.R., LACERDA, M.V., Malaria is associated with poor school performance in an endemic area of the Brazilian Amazon. **Malar J**. 2009 Oct 16;8():230.

VORASAN, N., PAN-NGUM, W., JITTAMALA, P., MANEEBOONYANG, W., RUKMANEE, P., LAWPOOLSRI, S. Long-term impact of childhood malaria infection on school performance among school children in a malaria endemic area along the Thai-Myanmar border. **Malar J**. 2015 Oct 9;14:401.

WILSON, K.D., STUTZ, S.J., OCHOA, L.F., VALBUENA, G.A., CRAVENS, P.D., DINELEY, K.T., VARGAS, G., STEPHENS, R. Behavioural and neurological symptoms accompanied by cellular neuroinflammation in IL-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. **Malar J**. 2016 Aug 24;15(1):428.

WHITE, N.J. Anaemia and malaria. **Malar J**. 2018 Oct 19;17(1):371.

WHITTEN, R., MILNER, DA J.R., YEH, M.M. KAMIZA, S., MOLYNEUX, M.E. ET AL. Liver pathology in Malawian children with fatal encephalopathy. **Human Pathology**. 42 1230–1239.2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report**, 2022.

XIE, X.L., ZHOU, W.T., ZHANG, K.K., CHEN, L.J., WANG, Q. METH-Induced Neurotoxicity Is Alleviated by Lactulose Pretreatment Through Suppressing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Rat Striatum. **Front Neurosci**. 2018 Nov 2;12:802.

ZHAO, J., BI, W., XIAO, S., LAN, X., CHENG, X., ZHANG, J., LU, D., WEI, W., WANG, Y., LI, H., FU, Y., ZHU, L. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Sci Rep**. 2019 Apr 8;9(1):5790.

ZHU, R., LIU, L., ZHANG, G., DONG, J., REN, Z., LI, Z. The pathogenesis of gut microbiota in hepatic encephalopathy by the gut-liver-brain axis. **Biosci Rep**. 2023 Jun 28;43(6):BSR20222524.