



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

RENATO MATEUS SANTOS DE LIMA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA E GLUTAMATO NO  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM  
*Plasmodium berghei* ANKA**

BELÉM  
2024

RENATO MATEUS SANTOS DE LIMA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA E GLUTAMATO NO  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM  
*Plasmodium berghei* ANKA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular - PPGNBC da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira

BELÉM  
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)

---

L732a Lima, Renato Mateus Santos de.  
Avaliação dos níveis extracelulares de GABA e glutamato no sistema nervoso central de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* Anka / Renato Mateus Santos de Lima. — 2024.  
50 f. : il. color.

Orientador(a): Profª. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém, 2024.

1. Malária cerebral. 2. Alterações neurológicas. 3. Neuroquímica. 4. GABA. 5. Glutamato. I. Título.

CDD 573.8

---

RENATO MATEUS SANTOS DE LIMA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA E GLUTAMATO NO  
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM  
*Plasmodium berghei* ANKA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular - PPGNBC da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular  
Área de concentração: Neurociências.

Data da aprovação: 27/11/2024

Conceito: Excelente

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup> . Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luana Ketlen Reis Leão  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração aos meus familiares e amigos de longa data que me apoiaram com paciência e encorajamento ao longo de todos esses anos. Dedico este trabalho especialmente aos meus pais, Francisca e Gilberto, por serem minha base em todos os momentos, e aos amigos queridos Beatriz Guerreiro, Aimée Fonseca, Tatiana Sasaki, Paula Amaral, Maria Clara Albuquerque e Rafael Barbosa, pelo apoio incondicional e por tornarem os momentos difíceis mais leves. Sou imensamente grato por cada gesto de carinho e incentivo.

Deixo também um agradecimento especial à minha pequena irmã, Laura Lima, que, com sua genuína alegria e risadas contagiantes, me ensinou a ser um irmão mais velho melhor e tantas vezes iluminou meus dias mais desafiadores.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira (UFPA), minha mais sincera gratidão. Com sua experiência, dedicação e orientações sempre precisas, foi essencial para a concretização deste trabalho. Sua confiança e apoio foram cruciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao corpo docente do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE), minha gratidão pela partilha de conhecimentos, pelo exemplo de comprometimento com a ciência e pela constante inspiração e apoio.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), que me acolheu e ofereceu os recursos e a estrutura necessários para minha formação. Sem o compromisso da instituição com o ensino e a pesquisa, este trabalho não teria sido possível.

Aos amigos e colegas do LNE, em especial Mateus D'Ávila, Luana Carvalho, Emerson Pinheiro, Caroline Lima, Stella Jasmine, Isabella Barros, Geovanna Saito, Vanessa Santos, Milena Martins e o grande Grupo da Malária, meu muito obrigado pelo companheirismo, pelas trocas de experiências e pelo espírito de equipe. Vocês tornaram os desafios mais leves e as conquistas ainda mais significativas. A convivência com vocês foi, sem dúvida, uma das partes mais enriquecedoras dessa jornada.

Aos queridos amigos do Laveran 2023, Janaína, Caio, Cinthia, Nyanne, Jady, Rafael e Lidia pelos momentos de descontração e generosidade. Gratidão imensa por essa amizade que a ciência criou.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui, deixo minha eterna gratidão e reconhecimento. Muito obrigado!

“[...] São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará pelas suas próprias respostas [...] e elas lhe serão preciosas.” (Patrick Rothfuss, “O Temor do Sábio, 2011, p. 545.)

## RESUMO

A malária cerebral (MC), causada pela infecção por *Plasmodium falciparum*, é altamente mortal, especialmente em crianças menores de 5 anos, e deixa sequelas neurológicas em até 25% dos sobreviventes. Apesar da associação de eventos vasculares e hemorrágicos com alterações neurológicas na MC, pouco se sabe sobre os mecanismos neuroquímicos envolvidos. Este estudo visou caracterizar as alterações nos níveis dos neurotransmissores glutamato (GLU) e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central (SNC) durante a malária cerebral experimental (MCE). A MCE foi induzida em camundongos Swiss com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), e os animais foram monitorados quanto à parasitemia, curva de sobrevivência e alterações neurológicas, utilizando o protocolo Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS). No 7º dia pós-infecção (d.p.i), os animais foram perfundidos com corante azul de Evans e solução salina para avaliação da barreira hematoencefálica (BHE). Os resultados mostraram que, a partir do 6º d.p.i, os animais começaram a sucumbir à MCE, com 100% de mortalidade até o 10º d.p.i. Alterações significativas na marcha, autopreservação e desempenho motor foram observadas. Extravasamento significativo de azul de Evans indicou comprometimento da BHE no 7º d.p.i. Houve aumento nos níveis extracelulares de GLU no cérebro e cerebelo nos dias 3, 5 e 7 pós-infecção. Os níveis de GABA aumentaram nos dias 3 e 5, retornando ao normal no dia 7. No cerebelo, os níveis de GABA não apresentaram alterações significativas. Esses resultados indicam que as alterações na neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica acompanham as mudanças neurológicas durante a infecção por PbA, sugerindo o envolvimento desses sistemas no desenvolvimento da MCE e oferecendo novas perspectivas para a compreensão da patogênese dessa complicação.

**Palavras chaves:** Malária cerebral; alterações neurológicas; neuroquímica; GABA; glutamato.

## ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) caused by *Plasmodium falciparum* results in high mortality, especially in children under 5, with up to 25% of survivors experiencing neurological sequelae such as cognitive impairment and seizures. The neurochemical mechanisms behind these impairments are not well understood. This study aimed to characterize changes in the levels of the neurotransmitters glutamate (GLU) and  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) in the central nervous system (CNS) during experimental cerebral malaria (ECM). ECM was induced in Swiss mice with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), and the animals were monitored for parasitemia, survival, and neurological impairments using the Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS). On the 7th day post-infection (d.p.i), blood-brain barrier (BBB) disruption was assessed using Evans Blue dye, and glial cell evaluation was performed by immunofluorescence. Results showed that PbA-infected mice began to succumb to CM by the 6th d.p.i, with 100% mortality by the 10th d.p.i. Behavioral impairments were observed from the early stages of infection. Significant BBB permeability changes and increased expression of glial activation markers were noted in infected mice. There was a marked increase in GLU levels in the brain and cerebellum on days 3, 5, and 7 post-infection. GABA levels increased on days 3 and 5, returning to control levels by day 7. These findings indicate significant neurochemical alterations in GABAergic and glutamatergic neurotransmission, accompanied by neurological and vascular impairments, suggesting their involvement in the development of neurological symptoms in CM.

**Key words:** Cerebral malaria; neurological impairment; neurochemistry; GABA; glutamate.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium* sp. no hospedeiro vertebrado (homem), pontuando seus estágios evolutivos..... 16
- Figura 2:** Representação das alterações clínicas e neurológicas decorrentes da malária cerebral.....18
- Figura 3:** Mecanismos propostos para a patogênese da malária cerebral, destacando o sequestro de eritrócitos parasitados, a quebra da barreira hematoencefálica e a exposição do parênquima cerebral. (Fonte: Autor; Biorender.com).....21
- Figura 4:** Linhagem de camundongos e sua susceptibilidade às alterações neurológicas características da MCE quando infectados com PbA. (Martins et al, 2009; De Souza & Riley, 2002) ..... 23
- Figura 5:** Neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, pontuando os mecanismos de síntese, liberação e captação essenciais para a manutenção dos níveis extracelulares dos neurotransmissores (Fonte: Autor; Biorender.com)..... 26
- Figura 6:** Representação da neurotransmissão glutamatérgica numa situação isquêmica.(Fonte: Adaptado de Armada-Moreira et al., 2020)..... 28
- Figura 7:** Desenho experimental ..... 32
- Figura 8:** Dados referentes aos parâmetros de caracterização da malária cerebral experimental. A) Curva de sobrevivência dos camundongos albino suíço inoculados com aproximadamente  $10^{-6}$  de eritrócitos parasitados com a cepa PbA. (n= 6 animais por grupo). B) Evolução da parasitemia em relação aos dias após a inoculação dos camundongos Albino Suíço infectados com a cepa PbA .....37
- Figura 9:** Alteração comportamental após inoculação da cepa PbA no 3º, 5º e 7º d.p.i. O comprometimento foi avaliado em cinco domínios diferentes: (A) coordenação, (B) performance motora, (C) tônus muscular e força, (D) reflexos e autopreservação e (E) comportamento tipo-higiene..... 39

<b>Figura 10:</b> Alteração motora pelo teste do campo aberto após inoculação da cepa PbA no 3º, 5º e 7º d.p.i. O comprometimento foi avaliado em cinco domínios diferentes.....	41
<b>Figura 11:</b> Avaliação do ensaio de permeabilidade vascular no 3º e 7º d.p.i .....	42
<b>Figura 12:</b> Quantificação dos níveis extracelular de GABA e glutamato.....	44
<b>Figura 13:</b> Quantificação dos níveis extracelulares de GABA e glutamato no cerebelo.....	45

### **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Categorias funcionais e parâmetros avaliados pelo protocolo do RMCBS. Fonte: Adaptado de CARROLL et. al., 2010... ..	33
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANKA</b>	ANtwepen-KAsapa
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BHE</b>	Barreira Hematoencefálica
<b>CEUA</b>	Comissão de ética do uso de animais
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>d.p.i.</b>	Dias pós-infecção
<b>EDTA</b>	Ácido Diaminotetracético
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ICAM</b>	Moléculas de Adesão Intercelular
<b>IL -10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LNE</b>	Laboratório de Neurofarmacologia Experimental
<b>MC</b>	Malária Cerebral
<b>MCE</b>	Malária Cerebral Experimental
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PbA</b>	Cepa ANKA de Plasmodium berghei
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PfEMP1</b>	Proteína de membrana do eritrócito 1 de Plasmodium falciparum
<b>pRBCs</b>	Eritrócitos Parasitados
<b>RMCBS</b>	Rapid murine coma and Behavior Scale
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>VCAM</b>	Moléculas de Adesão Vascular
<b>WHO</b>	- World Health Organization
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA.....	13
1.2. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA.....	15
1.3. ASPECTOS CLÍNICOS E SEQUELAS DA MALÁRIA CEREBRAL .....	17
1.4. NEUROPATOGÊNESE DA MALÁRIA CEREBRAL.....	20
1.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE MC .....	22
1.6. O PAPEL DOS NEUROTRANSMISSORES NA MC .....	24
1.7. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E GABAÉRGICO NA MC.....	25
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	31
3.2. INOCULAÇÃO DA CEPA ANKA DE <i>Plasmodium berghei</i> .....	31
3.3. ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS DA MCE: RAPID MURINE COMA AND BEHAVIOR SCALE (RMCBS) E TESTE DO CAMPO ABERTO. ....	32
3.4. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR POR MEIO DE ENSAIO DE EXTRAVASAMENTO.....	34
3.5. DOSAGEM DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA E GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	34
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MCE: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA E PARASITEMIA.....	37
4.2. A MCE INDUZ ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS VERIFICADAS PELO RMCBS E PELO TESTE DO CAMPO ABERTO. ....	38
4.3. A MCE INDUZ PROCESSOS HEMORRÁGICAS SOMENTE NO PERÍODO TERMINAL DA DOENÇA .....	42

4.4. ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO EXTRACELULAR DE GABA E  
GLUTAMATO ACOMPANHAM O DESENVOLVIMENTO DA MCE EM  
DIFERENTES REGIÕES DO SNC.....43

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
<b>8. ANEXO 1: CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA NA XXXVII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE).....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária cerebral (MC) compreende uma variedade de complicações neurológicas decorrentes da progressão de uma das parasitoses mais antigas: a malária. Também conhecida como paludismo, a malária tem como origem de seu nome o termo italiano “mal'aria”, que significa “ar ruim” para representar a associação da doença com áreas pantanosas (GETHING, 2015; TUTEJA, 2007). Ainda hoje é considerada uma das doenças infecciosas que mais contribui para a carga mundial de doenças, afetando mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo (OMS, 2023). Desse modo, a malária figura entre as três principais doenças infecciosas globais, impactando de forma significativa a morbidade, mortalidade e as economias das regiões mais afetadas pela proliferação do agente infeccioso (Hunt & Grau, 2003).

Segundo o último Relatório Mundial de Malária publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que, em 2022, foram notificados 249 milhões de novos casos de infecção e 608 mil mortes atribuídas à doença (OMS, 2023). Nesse contexto, a OMS destacou que 95% dos casos se concentraram na região africana, que também foi responsável por 96% das mortes registradas. Dentre essas mortes, 80% corresponderam a crianças menores de cinco anos (OMS, 2021). Nas Américas, apesar dos avanços significativos na eliminação da malária nos países endêmicos, esta doença continua sendo um importante problema de saúde pública.

No Brasil, a malária é endêmica e, de acordo com dados do Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), foram notificados 150 mil casos da doença em 2022. Dados recentes da OMS mostram uma redução no número de mortes por malária no Brasil em 2022, com 50 óbitos registrados, comparados aos 58 em 2021. A Amazônia brasileira que abrange os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins é responsável por 99% dos casos autóctones no Brasil. Em vista do impacto negativo que os altos casos notificados da doença representam, a região está incluída na meta da OMS de reduzir os casos de malária em pelo menos 90% até 2030 e erradicar a doença em pelo menos 35 países endêmicos nos próximos sete anos.

A transmissão da malária ocorre por meio da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*, característica que reflete o estado de endemia das regiões tropicais devido ao clima favorável à proliferação do mosquito vetor. A característica endêmica que a doença tem em relação a regiões como a região amazônica por exemplo se deve, em parte, à vasta

extensão geográfica, às condições climáticas e à ocupação desordenada, que favorecem o desenvolvimento dos vetores e dos agentes causadores da malária. (COSTA et al., 2010).

Quanto à etiologia da doença, a malária é uma doença infecciosa sistêmica causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. O ciclo de vida do parasita é complexo, incluindo uma fase de desenvolvimento no mosquito vetor, uma fase clinicamente assintomática no hospedeiro humano, uma fase extra-eritrocítica e a invasão de eritrócitos maduros pelos merozoítos, desencadeando o estágio patogênico intra-eritrocítico (MALAGUARNERA & MUSUMECI, 2002).

O *Plasmodium* consiste em mais de 200 espécies, infectando mamíferos, aves e répteis, e os parasitas da malária geralmente tendem a ser específicos do hospedeiro. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* são as cinco espécies conhecidas do gênero *Plasmodium* capazes de causar malária em humanos. *P. ovale* geralmente causa uma infecção "benigna", enquanto *P. malariae* frequentemente resulta em uma doença clinicamente silenciosa. *P. vivax* é uma causa comum de malária aguda, especialmente em regiões da Ásia, América do Sul e Oceania; raramente é fatal, mas pode contribuir para a anemia. Entretanto, a maioria dos casos graves e fatais de malária é causada pelo ciclo eritrocítico de *P. falciparum*, especialmente na África subsaariana e em muitos países tropicais, como é o caso do Brasil (SHOLFIELD & GRAU, 2005).

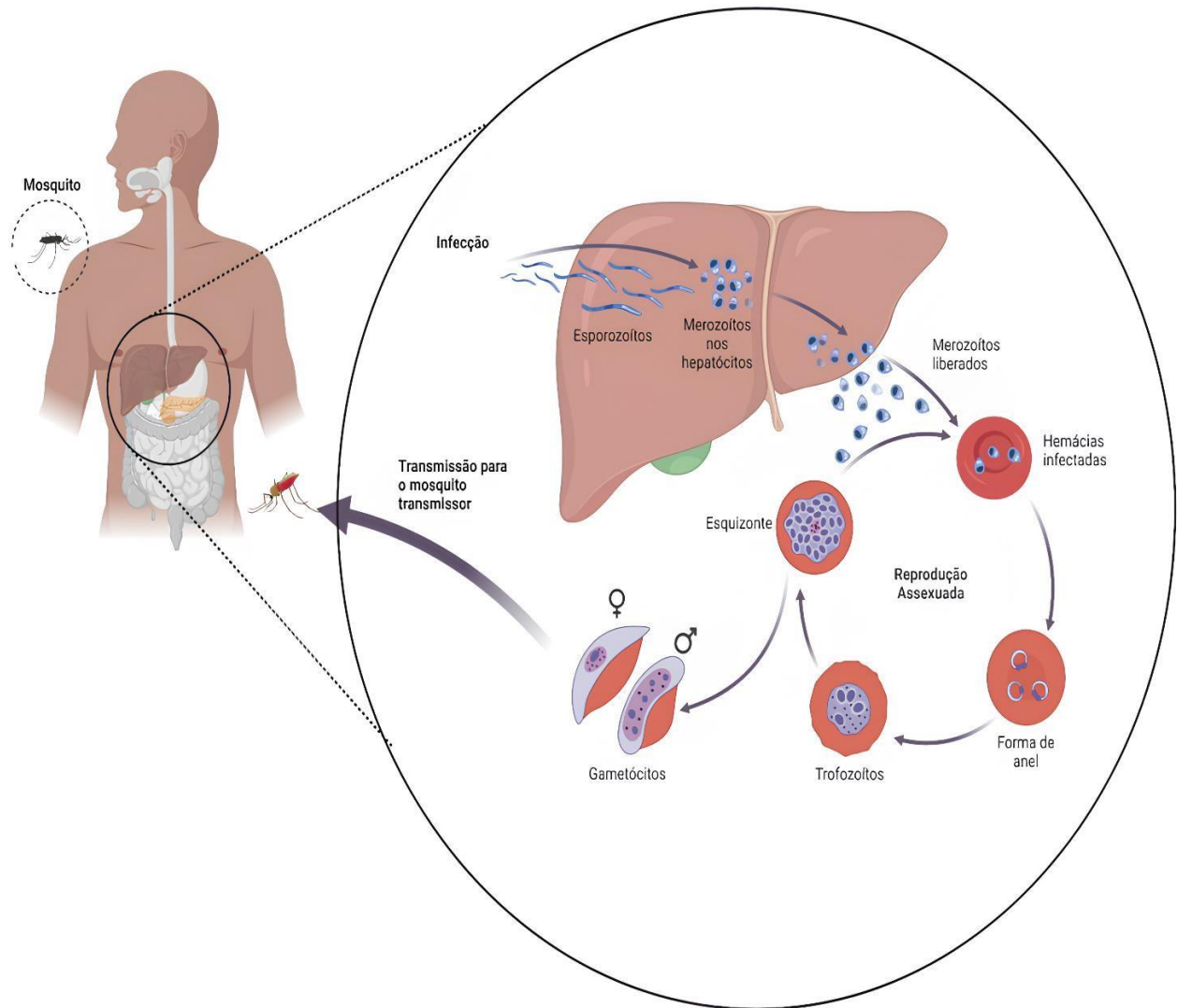
Dentro desse contexto, quando se fala em *P. falciparum*, pode ser pontuado que as complicações atreladas à espécie afetam sistemas vitais do organismo, como o sistema respiratório, e, especialmente, o sistema nervoso central (SNC) (IDRO et al, 2010). As alterações neurológicas decorrentes da malária têm sido objeto de extensos estudos, uma vez que suas consequências podem ser observadas mesmo após o tratamento atualmente utilizado para controle da infecção (BIRBECK et al, 2010; SCHIESS et al, 2020). Dessa forma, vários estudos buscam uma melhor compreensão dos mecanismos por trás dessas alterações a fim de um detalhamento amplo dos processos de interação entre o organismo humano e o parasito.

## 1.2. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E ASPECTOS CLÍNICOS DA MALÁRIA

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Plasmodium* é complexo e pode ser dividido em dois estágios (pré-eritrocítico e eritrocítico) a partir da inoculação de esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro após a picada do *Anopheles* (TUTEJA, 2007). Estes esporozoítos chegam ao fígado, penetram nos hepatócitos e transformam-se em esquizontes teciduais. Esse estágio de desenvolvimento do parasito é chamado pré-eritrocítico, podendo durar de 5 a 16 dias, período em que cada esquizonte dá origem a cerca de 30 mil merozoítos capazes de invadir os eritrócitos e levá-los a diversas regiões do organismo infectado, como os órgãos componentes do SNC (MILLER, 2002; TUTEJA, 2007).

A partir da invasão das células sanguíneas, inicia-se o estágio eritrocítico. Nessa fase, o merozoíto se desenvolve em trofozoíto jovem devido ao aumento da atividade metabólica e pelo consumo do ferro proveniente do grupamento heme da hemoglobina presente na célula sanguínea. Enquanto os eritrócitos mais jovens são alvo favorável de *P. vivax* e *P. ovale*, os eritrócitos de qualquer idade são invadidos por *P. falciparum* e *P. knowlesi*, enquanto que *P. malariae* prefere eritrócitos senescentes. Após diversas divisões celulares, o trofozoíto se desenvolve na forma de esquizonte contendo aproximadamente 20 novos merozoítos capazes de serem liberados na corrente sanguínea, os quais darão continuidade ao ciclo infectando outras hemácias. Os merozoítos que não invadem as hemácias se diferenciam em gametócitos que por sua vez é a forma infectante para o agente vetorial, como mostrado na figura 1 (FREVERT 1993; MILLER 2002; TUTEJA, 2007).





**Figura 1:** Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium* sp. no hospedeiro vertebrado (homem), pontuando seus estágios evolutivos. (figura: Autor; BioRender.com)

Nos estágios iniciais da infecção, a malária se manifesta com sintomas não específicos como náuseas e diarreia. Com a hemólise das células infectadas, ocorre a liberação de antígenos capazes de ativar a resposta imune do hospedeiro. Dessa maneira, o estágio eritrocítico marca o início da manifestação dos sintomas clínicos clássicos da malária, tais quais: febre, cefaleia, dores na região abdominal, náuseas e vômitos (DE SOUZA & RILEY, 2002; GOMES et al., 2011; ROSA-GONÇALVES et al, 2022).

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, variando de acordo com a duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, e 72 horas para *Plasmodium malariae*. No entanto, a observação dessa regularidade é incomum nos dias atuais, devido ao tratamento precoce, realizado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, às infecções por

populações distintas de plasmódios e à infecção em hospedeiros não-imunes, que apresentam um retardo na resposta imune específica (DE SOUZA & RILEY, 2002; GOMES et al., 2011; ROSA-GONÇALVES et al, 2022).

Além dos ataques paroxísticos, a malária principalmente associada ao *P. falciparum* pode se manifestar através de diversos sinais neurológicos focais, bem como alterações cognitivas e comportamentais. Estudos histopatológicos em material *post-mortem* humano revelam uma correlação significativa entre essas manifestações clínicas e diversas alterações patológicas, como o acúmulo de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, adesão endotelial e sinais morfológicos de ativação de células da glia. Adicionalmente, são frequentes a presença de hemorragia no parênquima cerebral, além de edema cerebral, notadamente nos estágios finais da doença. Esses achados sublinham a complexidade das interações entre o *Plasmodium falciparum* e o sistema nervoso central, destacando a necessidade de uma compreensão aprofundada dos mecanismos patogênicos pressupostos a doença. (ASHLEY et al, 2018; GOMES et al, 2011).

### **1.3. ASPECTOS CLÍNICOS E SEQUELAS DA MALÁRIA CEREBRAL**

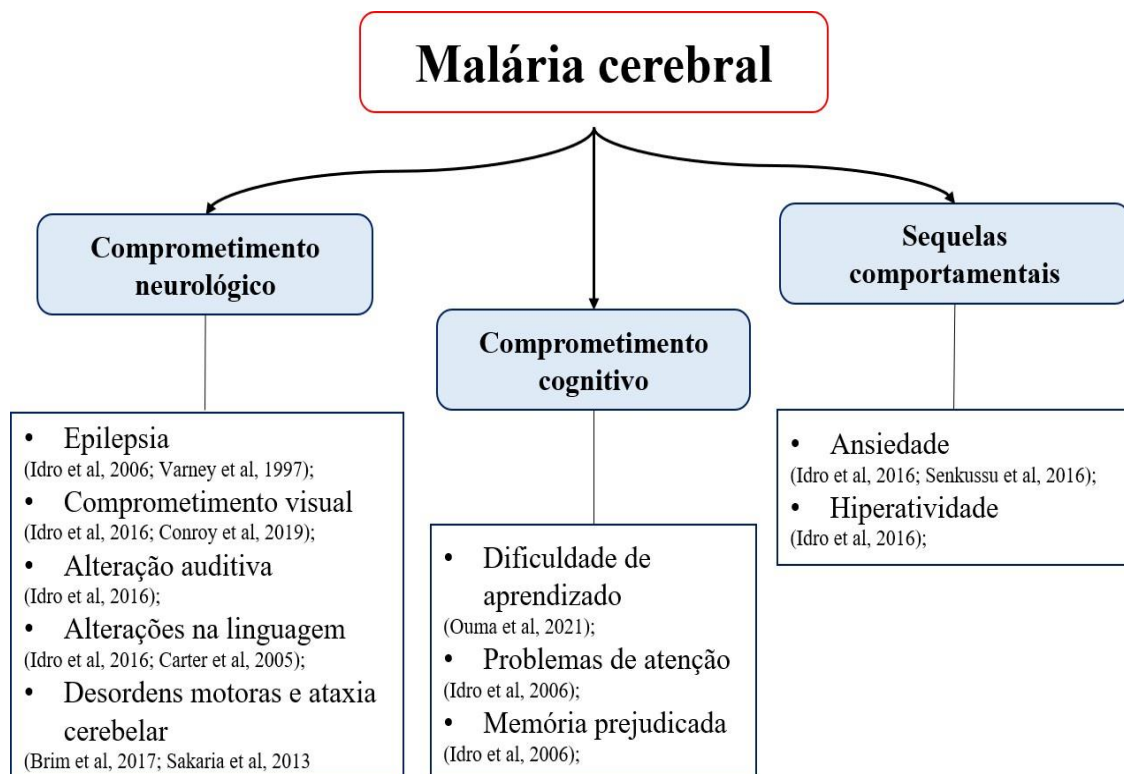
A malária cerebral (MC) é a complicação mais grave e letal decorrente da infecção por *Plasmodium falciparum*. Quanto a sua caracterização, a doença tem como principais aspectos clínicos o estado de coma acompanhado de episódios convulsivos, febre, cefaleia, hipoglicemia e acidose metabólica associados a presença de formas assexuadas do parasito na circulação periférica do indivíduo (BEALES et al, 2000; BIRBECK et al, 2010; PHILLIPS et al, 2017)

Aproximadamente 500 mil crianças desenvolvem malária cerebral na África a cada ano e a condição está associada a uma taxa de mortalidade de 15-25%. Dentre os afetados pelo agravamento neurológico da doença, 25% dos sobreviventes, principalmente crianças, desenvolvem sequelas neurológicas de longo prazo, mesmo após receberem tratamento adequado. (SHIESS et al, 2020).

Ao analisar as alterações neurológicas causadas pela MC, supõe-se que os prejuízos comportamentais e cognitivos decorram de danos em diversas áreas do SNC, como os lobos frontais (associados a funções executivas), áreas do lobo temporal medial e o sistema hipocampal (envolvidos na formação da memória), retina e cerebelo (responsáveis pela coordenação dos movimentos) (KIHARA, 2009; SCHIESS et al, 2020). Nos estágios finais da doença, crianças diagnosticadas frequentemente exibem disfunção do tronco cerebral, como reflexos pupilares e corneanos anormais e padrões respiratórios irregulares (BIRBECK et al,

2010; IDRO et al, 2006; SCHIESS et al, 2020). Embora algumas sequelas, como a cegueira cortical, possam melhorar com o tempo, o acompanhamento a longo prazo de sobreviventes pediátricos da doença revelou uma persistência elevada de sequelas neurológicas resumidas no infográfico presente na figura 2.

Episódios de epilepsia são frequentemente relatados, acometendo aproximadamente 60% das crianças com MC mesmo após a entrada no hospital (SCHIESS et al 2020). Essas sequelas podem levar a uma qualidade de vida significativamente prejudicada e à perda de anos de vida devido às adversidades decorrentes dessas alterações graves.



**Figura 2:** Representação das alterações clínicas e neurológicas decorrentes da malária cerebral. (Adaptado de: ROSA-GONÇALVES, 2022).

Os fatores exatos que levam a esses desfechos neurológicos nos pacientes diagnosticados com malária não são totalmente claros, mas análises *post-mortem* revelaram que o sequestro de hemácias infectadas por *Plasmodium* spp. na periferia dos vasos está associado a danos perivasculares, incluindo lesão axonal, morte celular e ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) (DOROVINI-ZIS, 2011; NISHANT, 2019). O mecanismo pelo qual

o sequestro leva ao comprometimento das funções da BBB é alvo de estudos até hoje, porém os principais eventos associados ao fenômeno estão ligados a tempestade de citocinas e o contato de fatores plasmáticos tóxicos com as células componentes do parênquima cerebral: neurônios e células da glia (astrócitos e microglia) (ATAÍDE et al, 2021; IDRO et al, 2010; SHIESS et al, 2020)

Interessantemente, em pacientes pediátricos com malária cerebral, o sequestro ocorre na vasculatura cerebral independentemente da região, mas a patologia *post-mortem* revelou diferentes respostas vasculares do hospedeiro. Além disso, a MC por *P. falciparum* em adultos também apresenta predominância de danos na substância branca, conforme mostrado por patologia *post-mortem* e ressonância magnética (MRI) (NAGATAKE et al, 1992; WIJICKS et al, 2018). Uma predominância de múltiplas lesões hemorrágicas pontuais é observada na substância branca e no corpo caloso, mas não em outras regiões do cérebro, como substância cinzenta ou gânglios basais (SHIESS et al, 2020; TAYLOR et al, 2014). Perda de neurônios cerebelares também foram observados a partir de análises histológicas do córtex cerebelar de pacientes acometidos pela doença, evidenciando fenômenos citotóxicos relacionados ao parênquima cerebral (HIJAZI et al, 2022).

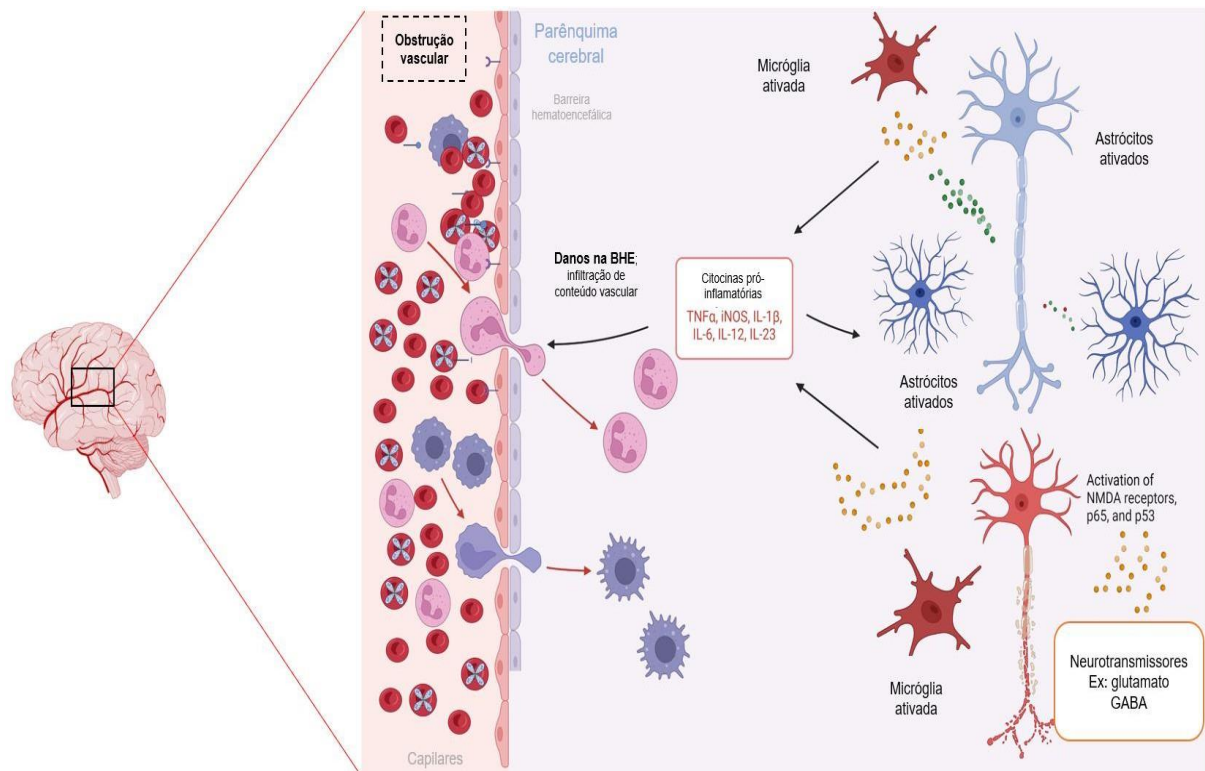
O comprometimento do cerebelo é uma manifestação neurológica significativa da malária cerebral. As células de Purkinje, neurônios localizados na camada média do córtex cerebelar, desempenham um papel crucial na coordenação motora e são comumente danificadas. Esse dano é frequentemente associado a hipertermia, uma elevação extrema da temperatura corporal, mas outros mecanismos patogênicos também podem contribuir para a lesão neuronal nesta região (HIJAZI et al, 2022; SAKARIA et al, 2013). O comprometimento cerebelar pode dominar as manifestações clínicas da MC e geralmente se resolve juntamente com outras manifestações cerebrais.

Apesar de poucos descritos, observações como essas podem estar interligadas com casos de ataxia cerebelar anteriormente descritos como sequelas graves da doença. Com essas informações, fica claro que a doença é capaz de afetar de maneiras diferentes em diferentes regiões do SNC de maneira que o entendimento dessas consequência é de extremo interesse para a compreensão dos processos patológicos derivados do desenvolvimento da MC.

#### 1.4. NEUROPATHOGENESE DA MALÁRIA CEREBRAL

O impacto das alterações neurológicas na vida dos indivíduos acometidos pela malária cerebral tornou essa complicação um objeto de estudo para muitos pesquisadores ao redor do mundo. A patogênese da MC fatal ainda não está completamente elucidada, embora vários processos patogênicos tenham sido propostos. Entre esses fenômenos, destacam-se na literatura a redução no transporte sanguíneo devido ao bloqueio da microvasculatura por hemácias parasitadas, a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias potencialmente prejudiciais por células imunológicas hiperativadas do hospedeiro e a coagulopatia induzida pela reação imune (figura 3). Nesse contexto, dois mecanismos centrais na patogênese da complicação são a oclusão vascular e as hipóteses inflamatórias (SHIESS et al, 2022; NISHANT, 2019; IDRO, et al, 2010)

Uma particularidade da malária causada por *P. falciparum*, em comparação com outras espécies de Plasmodium, é o sequestro de eritrócitos infectados nas vênulas de vários órgãos, particularmente no cérebro, o que leva a complicações da malária, especialmente às manifestações neurológicas. Hemácias infectadas tendem a obstruir a microvasculatura ao se ligarem à proteína de membrana do eritrócito 1 (PfEMP1) na superfície dos eritrócitos parasitados, conectando-se a proteínas de superfície das células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e o receptor da proteína C endotelial (EPCR) (LAU et al, 2015; GHAZANFARI et al, 2018). A obstrução microvascular durante a infecção por *P. falciparum* pode ser agravada pela formação de rosetas e aglomerados resultantes da ligação de hemácias não infectadas por hemácias infectadas e da agregação de hemácias infectadas e plaquetas, resultando em quadros de hipóxia (PONSFORD et al, 2012).



**Figura 3:** Mecanismos propostos para a patogênese da malária cerebral, destacando o sequestro de eritrócitos parasitados, a quebra da barreira hematoencefálica e a exposição do parênquima cerebral. (Fonte: Autor; Biorender.com)

Com esse acúmulo observado, a resposta imunológica nessas regiões pode estar relacionada com os danos neurológicos da malária cerebral. Embora os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias aumentem após a infecção por *P. falciparum*, os papéis exatos dessas moléculas na patogênese da doença ainda não são claros. Níveis elevados de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6 e IL-10 são observados em pacientes com MC em comparação com aqueles sem malária (IDRO et al, 2010; LENNARTZ et al, 2017; TRIVEDI, 2022). Um estudo demonstrou que os níveis de IL-6, IL-10 e TNF foram significativamente elevados em pacientes com doença grave envolvendo múltiplos órgãos, mas não em pacientes com distúrbios neurológicos da doença sem envolvimento de múltiplos órgãos (GIMENEZ et al, 2003; TRIVEDI, 2022). Isso pode sugerir que essas citocinas estão envolvidas na patogênese da malária grave, mas não diretamente no coma, deixando a origem desse fenômeno ainda inconclusivo.

Com todos esses eventos na região vascular, a observação de um comprometimento na integridade da BHE abriu caminho para o entendimento do impacto desses fenômenos no parênquima cerebral durante a MC (NISHANT, 2019; SCHIESS et al, 2020). A BHE, composta

por células endoteliais, pericitos e astrócitos, desempenha um papel crucial no controle da troca de substâncias entre o sangue e o cérebro. Pacientes com MC frequentemente apresentam comprometimento dessa barreira (GITAU & NEWTON, 2005). Análises *post-mortem* de cérebros de adultos com malária cerebral mostraram ativação generalizada das células endoteliais vasculares com ruptura das proteínas de junção celular, especialmente em vasos contendo eritrócitos infectados. Esse processo pode permitir que metabólitos prejudiquem a consciência ou precipitem convulsões (JAIN et al, 2008. TRIVEDI, 2022). No entanto, esses fatores, embora relevantes para a manifestação de sintomas como coma ou convulsões, não parecem ser suficientes para explicar a reversibilidade da condição observada na maioria dos casos.

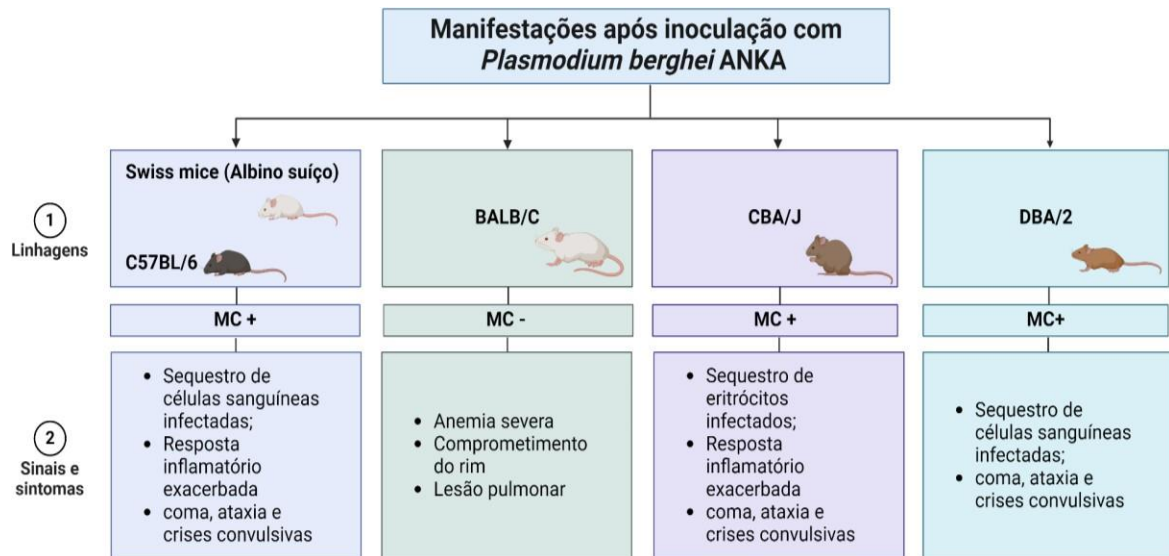
A exposição do parênquima cerebral tem sido associada a alterações nas células constituintes, como neurônios e células da glia, durante a malária cerebral. A perda neuronal e a atividade alterada das células da glia estão correlacionadas com os eventos patogênicos observados na doença (POSTELS et al, 2012). Processos excitotóxicos, que ocorrem durante o curso da MC, podem comprometer essas estruturas celulares e conseqüentemente seu funcionamento. Entretanto, mesmo com essas observações é possível perceber que muitos processos do desenvolvimento da doença possuem pouca elucidação e vem ganhando atenção devido a importância do seu entendimento completo.

### **1.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE MC**

Diante das dificuldades de acompanhar os processos patogênicos da MC humana, modelos animais foram desenvolvidos para estudar o curso da doença. As limitações na avaliação da patogênese da MC advêm, em grande parte, do fato de que a maioria dos dados disponíveis provém de estudos de autópsia (IDRO et al, 2010; Martins et al, 2009). Em função dessas limitações, a maioria dos estudos de patogênese tem sido realizada em modelos animais, principalmente em primatas e roedores (LOU et al, 2001).

O modelo murino de malária cerebral apresenta uma ampla diversidade de linhagens de camundongos e espécies de *Plasmodium* capazes de replicar os processos neurológicos da doença, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos atrelados a ela (COMBES et al, 2005). Entre essas linhagens, destacam-se camundongos C57BL/6 e Swiss (albino suíço), que, quando infectados com a cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), manifestam muitas características do processo infeccioso observadas em seres humanos (Figura 4). Isso justifica o

uso deste modelo para MC, dado o papel central das células alteradas nas lesões, as semelhanças entre os antígenos de malária definidos em roedores e as vias de resposta imune.



**Figura 4:** Linhagem de camundongos e sua susceptibilidade às alterações neurológicas características da MCE quando infectados com PbA. (Martins et al, 2009; De Souza & Riley, 2002)

O *Plasmodium berghei* é a espécie mais utilizada em pesquisas sobre malária cerebral experimental (MCE), pois estudos demonstram a presença de sinais neurológicos semelhantes aos da infecção por *P. falciparum* em camundongos geneticamente suscetíveis à cepa ANKA dessa espécie. Entre esses sinais neurológicos, destacam-se coma, ataxia e crises convulsivas (WHEELER ET AL., 2000).

Entre as linhagens de camundongos infectados por *P. berghei*, há aquelas resistentes ao desenvolvimento da MC, como BALB/C e A/J, e as linhagens suscetíveis às complicações neurológicas da infecção, como C57Bl/6, CBA e Albino Suíço (HUNT et al., 2010; KOSSODO et al., 1993; MARTINS et al., 2009). Além das manifestações neurológicas, as linhagens suscetíveis apresentam semelhanças à MC humana no que se refere à ativação de células microgliais e endoteliais e à expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essas condições são acompanhadas de baixa parasitemia e evolução para óbito entre o 6º e 10º dia pós-infecção (BAGOT et al., 2002; CROMPTON et al., 2014).

Do ponto de vista histopatológico, nos modelos murinos de MCE, pode-se observar a obstrução dos vasos devido à aderência de leucócitos ao endotélio vascular, gerando um quadro



de hipóxia e rompimento da barreira hematoencefálica juntamente com alterações neurológicas (GOMES et al., 2011). Esses achados da utilização de modelos experimentais como ferramenta importante para estudar os mecanismos inerentes à patogênese da malária cerebral, sendo indispensável para a investigação de novos processos patogênicos associados a comunicação neuronal presente no parênquima cerebral.

### **1.6. O PAPEL DOS NEUROTRANSMISSORES NA MC**

O SNC processa e envia informações ao sistema nervoso periférico através da condução de sinais neurais de um neurônio para outro nas sinapses. A neurotransmissão, ou transmissão sináptica, refere-se a esse processo de comunicação entre neurônios, permitindo que o SNC controle os músculos lisos, esqueléticos e cardíacos, além de regular as secreções corporais e as funções orgânicas (TELEANU et al, 2022)

Neurotransmissores desempenham um papel fundamental na fisiologia dos sistemas nervoso central e periférico, sendo cruciais para eficiente transmissão de informações neurais, tanto por meio de sinais elétricos quanto químicos (RANGEL-GOMEZ E MEETER, 2016). Essas moléculas sinalizadoras desempenham papéis cruciais na comunicação neurosensoriais, motoras e integrativas, influenciando diversas funções como emoções, memórias e movimentos. Em termos funcionais, eles podem ser categorizados como excitatórios, inibitórios, neuromoduladores e neuro-hormônios (RIZO, 2018)

Os neurotransmissores excitatórios, como glutamato, acetilcolina, histamina, dopamina e norepinefrina, estimulam as células-alvo a agir, promovendo a geração do potencial de ação. Por outro lado, neurotransmissores inibitórios, como dopamina, serotonina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), diminuem as chances de atividades celulares iniciarem. Neuromoduladores, como dopamina, acetilcolina, serotonina, norepinefrina e histamina, enviam mensagens para múltiplos neurônios simultaneamente. Por fim, neuro-hormônios, como ocitocina e vasopressina, induzem atividades hormonais (DANBOLT, 2001; RANGEL-GOMEZ E MEETER, 2016; SHEFFLER et al., 2022).

Para ser classificada como neurotransmissor, uma molécula deve atender aos seguintes critérios: ser sintetizada, liberada e armazenada pelo mesmo neurônio no terminal pré-sináptico; provocar uma resposta específica no neurônio pós-sináptico; quando administrada externamente, reproduzir o mesmo efeito; e sua ação no neurônio pós-sináptico pode ser interrompida por mecanismos específicos, como degradação extracelular ou recaptura por neurônios ou células gliais próximas. Qualquer falha nesses processos pode resultar em

alterações na disponibilidade desses neurotransmissores e/ou disfunções em sua atividade (NIYONAMBAZA et al, 2019; TELEANU et al, 2022). Por isso, desajustes nesses mecanismos são frequentemente observados em diversas doenças que afetam o sistema nervoso central, podendo ser valiosos no entendimento da patogênese da MC.

Processos neurodegenerativos observados na progressão da malária cerebral provavelmente resultam da interação entre neurotransmissores específicos em vários terminais nervosos e seus receptores. Relatos indicam que essas mudanças bioquímicas de base podem levar à perda celular e à desorganização histológica de áreas cerebrais, especialmente aquelas envolvidas na coordenação de atividades cognitivas, motoras e neurocomportamentais (ROY et al., 1993; CHA et al., 1998; SUDA et al., 2008; JAMWAL E KUMAR, 2019). Além disso, a interação entre neurotransmissores e moléculas receptoras específicas, juntamente com as expressões proteicas associadas, tem sido implicada nos complexos mecanismos em cascata da malária cerebral (DANIYAN et al, 2022).

Desse modo, a participação dessas moléculas sinalizadoras nas diversas manifestações neurológicas da MC evidencia o papel crucial da neuroquímica no desenvolvimento da doença. Embora existam poucos detalhes descritos sobre as alterações nos neurotransmissores na MC, muitas das sequelas características, como a epilepsia, têm como origem principal o desequilíbrio entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios no SNC (VAN HUGTE, 2023). Logo, todas as evidências apresentadas ratificam a ideia do presente trabalho de compreender o papel desses neurotransmissores, especialmente o GABA e o glutamato, na progressão da MC.

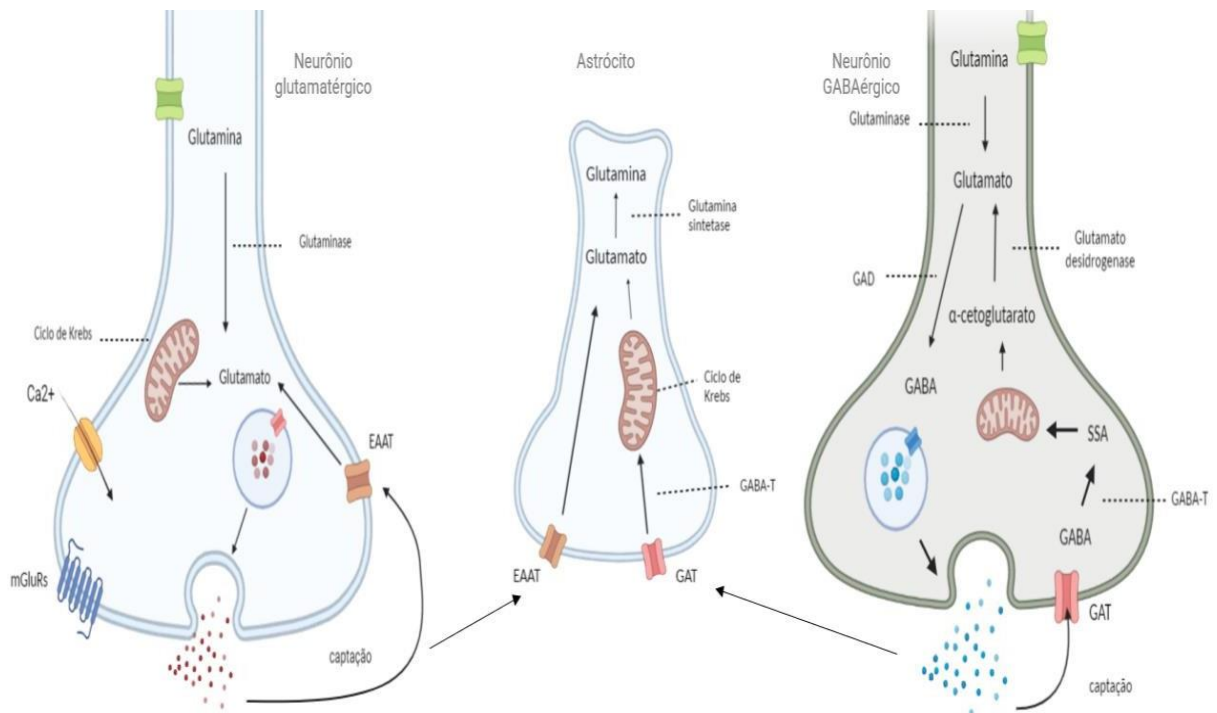
### **1.7. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E GABAÉRGICO NA MC**

Na MC, a exposição do parênquima cerebral após a ruptura da barreira hematoencefálica provoca mudanças estruturais e fisiológicas significativas. Isso inclui a ativação de células da micróglia, redistribuição de astrócitos e alterações neuroquímicas, principalmente na atividade dos sistemas de neurotransmissão, resultando em danos neuronais (NISHANTH, 2019). Alterações nos níveis extracelulares de neurotransmissores específicos são observadas em várias desordens neurológicas, como doença de Parkinson, depressão, esquizofrenia, doença de Alzheimer, ataxia cerebelar e epilepsia (HERLENIUS & LAGERCRANTZ, 2001; RIZO, 2018).

No contexto da neurotransmissão, o GABA e o glutamato são os sinalizadores mais abundantes no SNC, mediando respectivamente a geração de estímulos inibitórios e excitatórios. A atividade coordenada entre esses dois neurotransmissores é essencial, e

desequilíbrios na atividade deles estão fortemente associados com a etiologia de inúmeras desordens neurológicas presentes na MC (GAO et al., 2015; SEARS & HEWETT, 2021).

A excitotoxicidade resultante do desequilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória promovida por GABA e glutamato é o principal fenômeno relacionado à perda neuronal e consequente neurodegeneração. Diversas condições resultantes do mau funcionamento do SNC são associadas a distúrbios na atividade desses neurotransmissores, como isquemia cerebral, epilepsia e desordens neurodegenerativas (SEARS & HEWETT, 2021). O fato de algumas dessas condições acompanharem a evolução da MC e também se configurarem como sequelas da doença ressalta a importância de estudar o papel desses sistemas de neurotransmissão na MC (Figura 5).



**Figura 5:** Neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, pontuando os mecanismos de síntese, liberação e captação essenciais para a manutenção dos níveis extracelulares dos neurotransmissores (Fonte: Autor; Biorender.com).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e desempenha um papel crucial no desenvolvimento neuronal, plasticidade, memória e aprendizagem. No entanto, a manutenção dos níveis basais de glutamato no meio extracelular é primordial para o equilíbrio excitação/inibição no SNC, e o comprometimento desse sistema pode induzir morte celular e degeneração neuronal por meio da excitotoxicidade (SEARS & HEWETT, 2021).

A manutenção dos níveis extracelulares de glutamato é realizada por meio de seus mecanismos de síntese e transporte. O glutamato é sintetizado tanto em neurônios quanto em astrócitos pela hidrólise da glutamina catalisada pela enzima glutaminase e pela transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato proveniente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) no ciclo de Krebs. Uma vez produzido, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas (VGLUT 1-3) e liberado no meio extracelular em resposta ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no terminal axonal. Em condições de baixa oxigenação cerebral, o comprometimento na atividade dos canais iônicos gera um influxo anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular, aumentando a liberação de glutamato para o espaço extracelular (MCKENNA, 2007; SEARS & HEWETT, 2021). Por conta dessas características, diversas patologias, como a MC, podem ser relacionadas com elevação da liberação de glutamato na fenda sináptica.

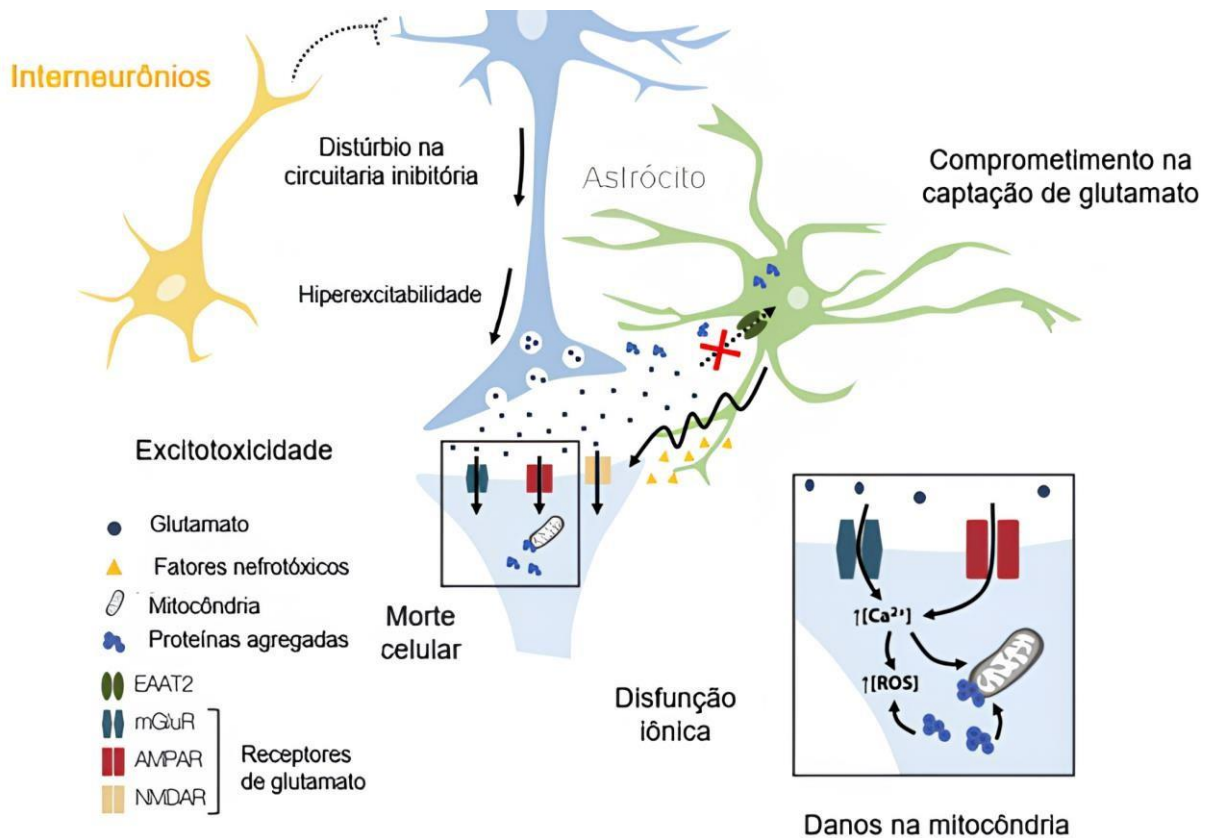
Para manter os níveis basais, a remoção do glutamato extracelular é realizada por proteínas transportadoras dependentes de  $\text{Na}^+$  (EAATs 1-5), expressas em neurônios e células gliais (astrócitos). Esses transportadores realizam a captação do glutamato de maneira eletrogênica, com o cotransporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  e o contratransporte de  $\text{K}^+$ . Durante processos isquêmicos, o gradiente desses íons ao longo da membrana plasmática é alterado, causando a reversão do transporte pelos EAATs, que passam a liberar o glutamato em vez de retirá-lo da fenda sináptica (DANBOLT, 2001; SEARS & HEWETT, 2021).

Processos inflamatórios estão correlacionados com distúrbios nos mecanismos de transporte de glutamato. Estudos mostram que citocinas pró-inflamatórias, como o  $\text{TNF-}\alpha$ , interferem na captação do neurotransmissor ao reduzir a expressão dos EAATs, além de estimular a injúria neuronal por aumentar a liberação de glutamato no espaço sináptico (Figura 6) (HU et al., 2000; KORN et al., 2005).

Miranda et al. (2010) observaram que o desenvolvimento da MC em modelo murino é acompanhado pelo aumento nas concentrações de glutamato no tecido cortical de animais infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* no 6º dia pós-infecção, sugerindo que o prejuízo na manutenção dos níveis extracelulares do neurotransmissor pode estar associado com as alterações cognitivas decorrentes da patologia. No entanto, não se avaliou a atividade do neurotransmissor ao longo do desenvolvimento da doença. Dessa forma, estudos envolvendo o metabolismo do neurotransmissor em condições patológicas, como isquemia cerebral e epilepsia, associadas a alterações no sistema glutamatérgico presentes na MC, são de extrema relevância.

Uma vez liberado no espaço extracelular, o glutamato interage com receptores ligados a canais iônicos (iGluRs) e receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGluRs)

expressos na membrana dos neurônios pós-sinápticos. A ativação de receptores iônicos provoca o influxo de íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , essenciais para a despolarização celular, liberação de neurotransmissores e plasticidade (TRAYNELIS et al., 2010). Destacam-se os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) devido à sua permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Quando excessivamente estimulados, os receptores NMDA estão relacionados a danos neuronais e morte celular devido à excitotoxicidade.



**Figura 6:** Representação da neurotransmissão glutamatérgica numa situação isquêmica.(Fonte: Adaptado de Armada-Moreira et al., 2020)

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, desempenhando um papel importante na modulação da transmissão sináptica. Assim como o glutamato, o GABA também possui mecanismos de regulação de seus níveis extracelulares. A síntese de GABA é realizada pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), que catalisa a conversão do glutamato em GABA. A degradação do GABA ocorre no meio intracelular pela enzima GABA transaminase (MARTIN et al., 1993). Uma vez sintetizado, o neurotransmissor é armazenado em vesículas sinápticas (VGATs) para posterior liberação na fenda sináptica (CHAUDHRY et al., 1998).

O equilíbrio das concentrações extracelulares de GABA é promovido pela atividade dos transportadores de alta afinidade dependentes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (GATs 1-3). Os transportadores de GABA têm relevância farmacológica, e a administração de bloqueadores de GAT é utilizada em várias terapias anticonvulsivantes. Assim como no caso do glutamato, o comprometimento do gradiente desses íons em condições isquêmicas pode prejudicar a captação de GABA, levando a desordens na neurotransmissão gabaérgica (SEARS & HEWETT, 2021).

O funcionamento ideal do SNC requer homeostasia entre estímulos inibitórios e excitatórios produzidos por GABA e glutamato, respectivamente. A atividade coordenada desses neurotransmissores é essencial para processos cerebrais complexos, e desequilíbrios na atividade deles estão fortemente associados com a etiologia de inúmeras desordens neurológicas, como ansiedade, esquizofrenia, isquemia cerebral e epilepsia (GAO et al., 2015; SEARS & HEWETT, 2021)

Dada a carência de estudos que esclareçam o impacto da atividade desses sistemas de neurotransmissão nas desordens decorrentes da malária cerebral, este trabalho busca analisar se o desenvolvimento dos danos neurológicos em diferentes regiões do SNC está acompanhado de alterações nos níveis extracelulares de neurotransmissores GABA e glutamato na malária cerebral murina

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os níveis extracelulares de GABA e glutamato no cérebro e cerebelo de camundongos infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os parâmetros clínicos da malária cerebral experimental pela avaliação da sobrevivência e da porcentagem de parasitemia dos animais infectados no 3º, 5º e 7º dia pós infecção.
- Avaliar a integridade da barreira hematoencefálica pelo ensaio de permeabilidade vascular com corante azul de Evans no 3º e 7º dia pós infecção.
- Analisar o comprometimento neurológico decorrente da malária cerebral experimental no 3º, 5º e 7º dia pós infecção pelo protocolo do teste do campo aberto e do *Rapid Murine Coma and Behavior Scale*.
- Avaliar a liberação de GABA e glutamato no cérebro e no cerebelo dos animais infectados com a cepa PbA no 3º, 5º e 7º dia pós infecção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

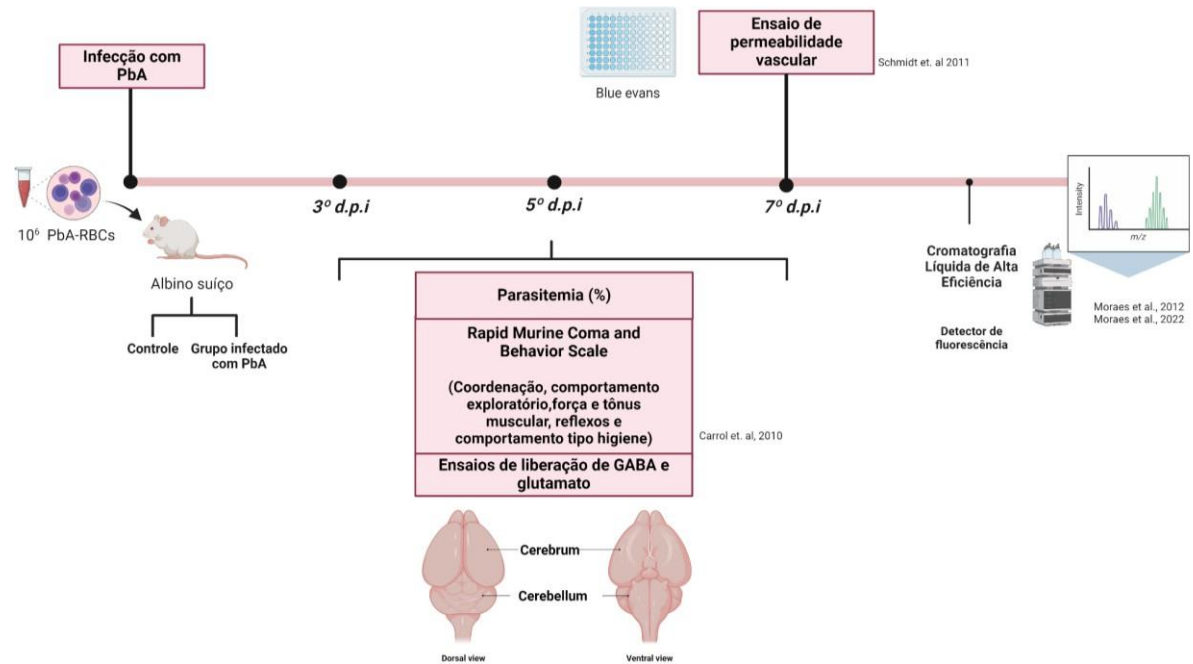
Para a realização deste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem Albino Suíço (fêmeas e machos), com idade entre 6 e 8 semanas e peso médio de 20 a 25 gramas, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram alojados em condições que permitiam acesso livre à água e comida, em gaiolas de propileno com no máximo cinco animais cada, mantidas em ambiente com temperatura e iluminação controladas. Este estudo seguiu as normas éticas estabelecidas e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob parecer nº 6211241117.

#### 3.2. INOCULAÇÃO DA CEPA ANKA DE *Plasmodium berghei*

A cepa ANKA de *Plasmodium berghei* foi utilizada para induzir a MCE nos grupos experimentais conforme descrito anteriormente por Ataíde et al (2021) (n=21) e todo o delineamento experimental foi organizado como exposto na Figura 7. Inicialmente, uma cepa proveniente do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental foi descongelada e inoculada em um camundongo de passagem para o restabelecimento da virulência. Uma vez que a parasitemia atingiu aproximadamente 10%, o sangue do animal foi coletado por punção cardíaca, utilizando uma seringa de insulina contendo heparina como anticoagulante e solução salina, para posterior infecção dos grupos experimentais. A fim de garantir uma inoculação uniforme, os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com inóculo padronizado de aproximadamente  $10^6$  eritrócitos parasitados diluídos em 100µl de tampão fosfato (PBS; pH: 7,4).

Para monitorar a infecção e caracterizar o quadro, a sobrevivência dos animais foi acompanhada juntamente com a contagem da parasitemia, que foi analisada através de esfregaços sanguíneos preparados a partir do sangue coletado da cauda do animal. Esses esfregaços foram fixados em metanol absoluto (P.A) por 5 minutos e, em seguida, corados com corante Giemsa (10%) por 10 minutos. A observação das lâminas foi conduzida em microscópio óptico (modelo NIKON E200), e a porcentagem de parasitemia de cada animal foi determinada pela razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e o total de 1000 células contadas.





**Figura 7: Delineamento experimental** (Auto Ilustração produzida em BioRender.com)

### 3.3. ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS NA MCE: RAPID MURINE COMA AND BEHAVIOR SCALE (RMCBS) E TESTE DO CAMPO ABERTO

A avaliação comportamental dos animais inoculados com a cepa PbA foi conduzida seguindo o protocolo do RMCBS, adaptado de Carroll et al., 2010. Este método consiste em 10 parâmetros (conforme mostrado na Tabela 1) pontuados de 0 a 2, onde uma pontuação de 0 indica menor desempenho do animal no teste, enquanto uma pontuação de 2 indica um desempenho elevado.

O objetivo do teste é analisar os parâmetros diretamente ligados com as funções do SNC que podem ser acessados em um tempo de 3 minutos cada animal. Após um período de 30 minutos de ambientação, os animais do grupo controle e do grupo PbA foram submetidos a avaliação do comportamento exploratório e de escape ao toque em uma caixa retangular transparente (comprimento: 31,8 cm; largura: 19,8 cm; altura: 10,5 cm). Posteriormente, observou-se a coloração dos pelos para determinar o score relacionado ao comportamento de higiene. A marcha do animal e a posição do corpo também foram analisados durante a execução dos testes anteriormente descritos.

Com o auxílio de uma grade, avaliou-se a força dos membros dos animais por meio de puxões realizados pela cauda. Em seguida, parâmetros ligados à autopreservação como agressão, presença ou ausência de reflexos das patas traseiras e dos pavilhões auriculares (*pinna reflex* e *toe pinch*) foram analisados com o auxílio, respectivamente, de uma haste e uma pinça. Por fim, nos 90 segundos finais de realização dos testes, o equilíbrio dos animais foi analisado a partir da capacidade de pendurar-se pelas patas em um arame.

<b>Domínios</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Score</b>
<b>I. Coordenação motora</b>	1. Marcha 2. Equilíbrio	0-4
<b>II. Comportamento exploratório</b>	1. Desempenho motor	0-2
<b>III. Força e tônus muscular</b>	1. Posição do corpo 2. Força dos membros	0-6
<b>IV. Reflexos de autopreservação</b>	1. Escape ao toque 2. Reflexo auricular ( <i>pinna reflex</i> ) 3. Reflexo nas patas traseiras ( <i>toe pinch</i> ) 4. Agressão	0-8
<b>V. Comportamento de higiene</b>	1. Piloereção	0-2

Tabela 1: Categorias funcionais e parâmetros avaliados pelo protocolo do RMCBS. Fonte: Adaptado de CARROLL et. al., 2010.

Além da aplicação do protocolo do RMCBS, foi realizado o teste do Campo Aberto, o qual foi utilizado para verificar o comprometimento locomotor dos animais acometidos com MC. Os animais foram colocados individualmente no centro de um aparato circular com dimensões de 83 cm de diâmetro e 52 cm de altura; para cada animal foi permitido que o mesmo explorasse o ambiente por 5 minutos. As sessões do teste foram devidamente gravadas com auxílio de uma câmera e, posteriormente, os vídeos foram analisados no software X-Plot-Rat 2005. Os dados coletados incluíram: número de quadrantes cruzados, frequência de apoio sob as patas traseiras (*rearing*) e a frequência de movimentos relacionados à higiene (*grooming*).

### **3.4. PERMEABILIDADE VASCULAR POR MEIO DO ENSAIO DE EVANS BLUE**

A fim de determinar a presença de extravasamento vascular no tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa PbA, realizou-se o ensaio de permeabilidade vascular utilizando o corante azul de evans como marcador, conforme método adaptado de Schmidt et al. (2011). No 3º e 7º dia pós-infecção, os camundongos dos grupos controle e infectados com PbA foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de cetamina (1 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1mg/kg), seguido da injeção de 200µl do corante azul de evans (2%) no coração de cada animal. Após a distribuição do corante pelo corpo, os animais foram perfundidos com 10 ml de solução salina (0,9%) e o cérebro foi coletado por craniotomia. O tecido cerebral foi então colocado em uma placa de Petri e fotografado sob uma lupa acoplada a um sistema de captura de imagem (NIKON, modelo SMZ 1500) para identificação de possível extravasamento vascular na microvasculatura. Após 48 horas de secagem em estufa, o corante foi extraído com 2 ml de formamida durante 48 horas e posteriormente quantificado por leitura de microplaca a 630 nm.

### **3.4. DOSAGEM DOS NÍVEIS EXTRACELULARES DE GABA E GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA**

Para análise quantitativa dos níveis extracelulares de GABA e glutamato, os cérebros dos animais foram extraídos e lavados três vezes com 2 mL de solução de Hank gelada por 10 minutos. Posteriormente, o tecido foi incubado com 2 mL de solução de Hank a 37°C por 20 minutos em uma estufa de CO<sub>2</sub>. A dosagem foi realizada utilizando-se o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu), equipado com bomba, detector de fluorescência, desgaseificador, módulo comunicador, injetor de amostras Rheodyne, com alça de injeção de 20 µl, coluna analítica C18, um sistema de aquisição de dados LC-Solution e microsseringa de 50 µl.

Para a quantificação dos aminoácidos, adicionou-se 20 µL de ácido tricloroacético (TCA, 1%) nas amostras, que foram posteriormente centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. 300 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados de 20 µL de homosserina. Em seguida, foi realizado o processo de derivatização em solução contendo O-ftalaldeído e N-acetilcisteína diluídos em metanol. Esse processo permite que os aminoácidos sejam quantificados por

fluorescência. Posteriormente, o material foi injetado no equipamento, com um fluxo de 1.0 mL/min e eluição em gradiente da fase móvel, dividida em Fase A (Tampão Acetato de Sódio; 5% de metanol + 12,5 mL de propanol; pH: 5,67) e Fase B (Metanol 70%). Os valores de GABA e glutamato foram determinados a partir de uma curva de concentração previamente realizada. Para a correção do dado, foi realizada dosagem de proteína segundo protocolo descrito por Bradford (1976).

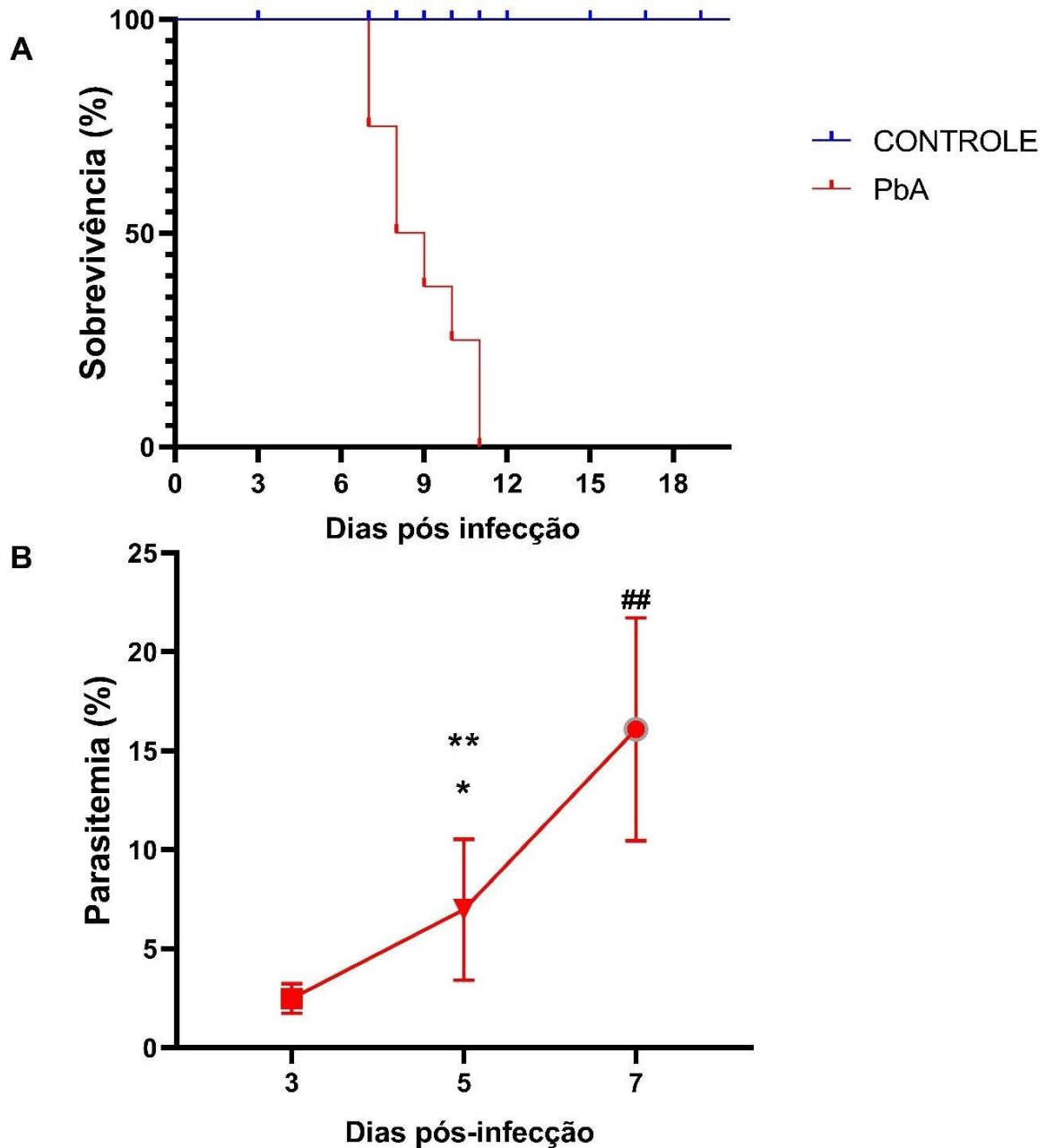
### **3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após a coleta dos dados, a análise de variância de uma via foi realizada seguida pelo pós-teste de *Tukey-Kramer*, utilizando o software Graphpad 9. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão para análises estruturais e bioquímicas. Os dados comportamentais estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. O nível de significância adotado foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA MCE: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA E PARASITEMIA

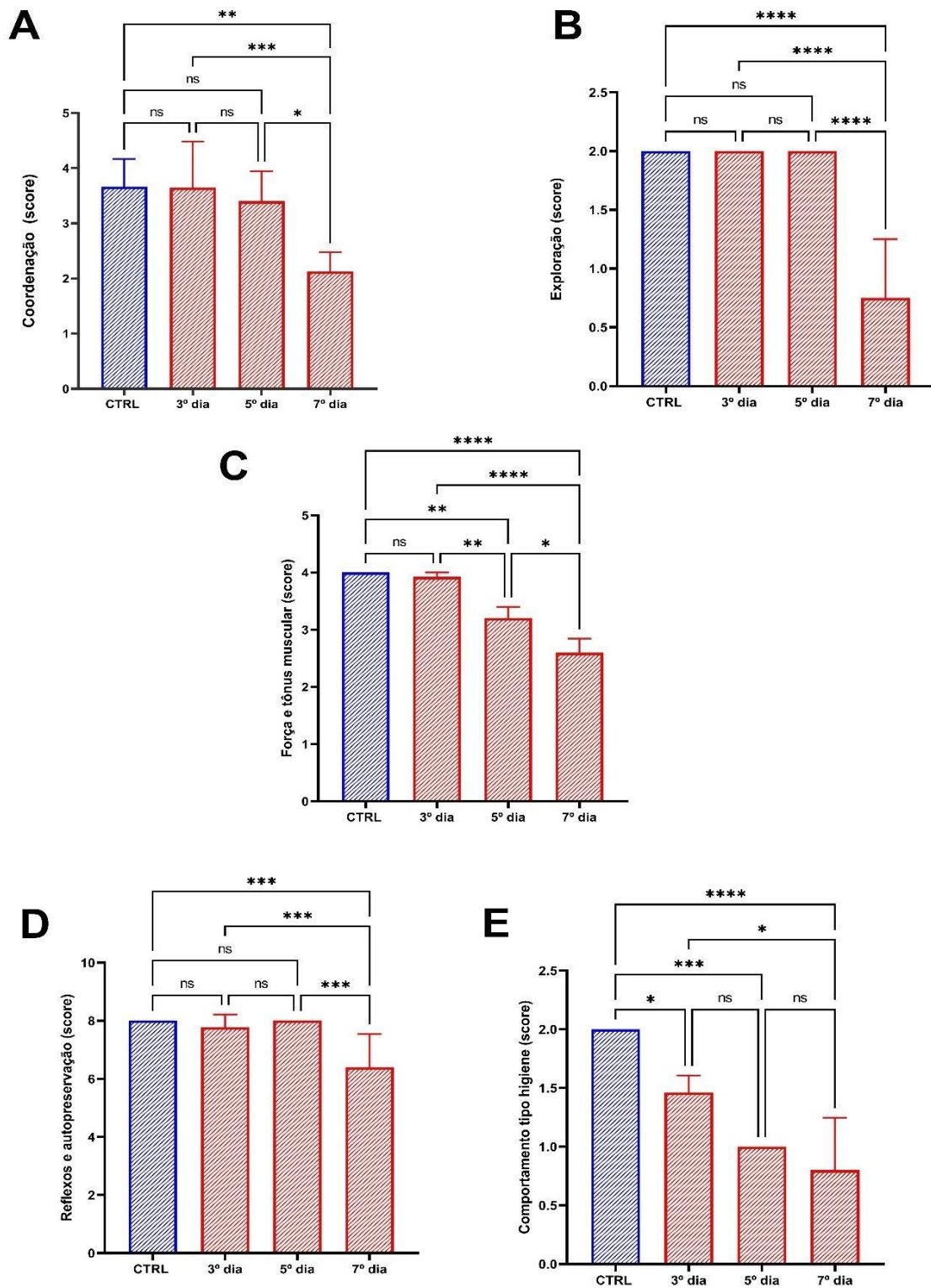
Para investigar o papel dos neurotransmissores GABA e glutamato no desenvolvimento da MCE, camundongos albino suíço (n=10/grupo) foram infectados com a cepa PbA e monitorados nos dias subsequentes à infecção para avaliação do surgimento dos sinais clínicos característicos da complicação. O gráfico 8A apresenta a curva de sobrevivência dos grupos experimentais, na qual se observa que os animais infectados com PbA começaram a evoluir a óbito a partir do 7º dia pós-infecção (d.p.i), com 100% de mortalidade antes do 10º d.p.i. Além da análise de sobrevivência, a porcentagem de parasitemia nos animais inoculados com PbA foi avaliada em diferentes períodos do desenvolvimento da doença, desde o início até a fase terminal da MCE. Com isso, a parasitemia foi verificada nos dias 3, 5 e 7 pós-inoculação por meio da contagem de hemácias em esfregaços sanguíneos. Os resultados, apresentados na Figura 8B, revelam uma progressiva elevação na quantidade de hemácias infectadas ao longo dos dias de análise, atingindo aproximadamente 20% durante o período crítico da doença, a partir do 7º dia pós-inoculação (3º d.p.i=3,6%±1,7%; 5º=6,9%±3,5%; 7º=16%±5%). Os dados demonstram que o modelo utilizado foi capaz de reproduzir todas as alterações agudas esperadas da MCE, sem qualquer correlação com hiperparasitemia das células sanguíneas nos camundongos infectados.



**Figura 8:** Dados referentes aos parâmetros de caracterização da malária cerebral experimental. A) Curva de sobrevivência dos camundongos albino suíço inoculados com aproximadamente  $10^{-6}$  de eritrócitos parasitados com a cepa PbA. (n= 6 animais por grupo). B) Evolução da parasitemia em relação aos dias após a inoculação dos camundongos Albino Suíço infectados com a cepa PbA. Dados expressos em média±DVP. 3° d.p.i vs 7° d.p.i; ##p<0,001; 5° d.p.i vs 7° d.p.i; \*\*\*p<0,001.

## 4.2. A MCE INDUZ ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS PELO RMCBS E PELO TESTE DO CAMPO ABERTO

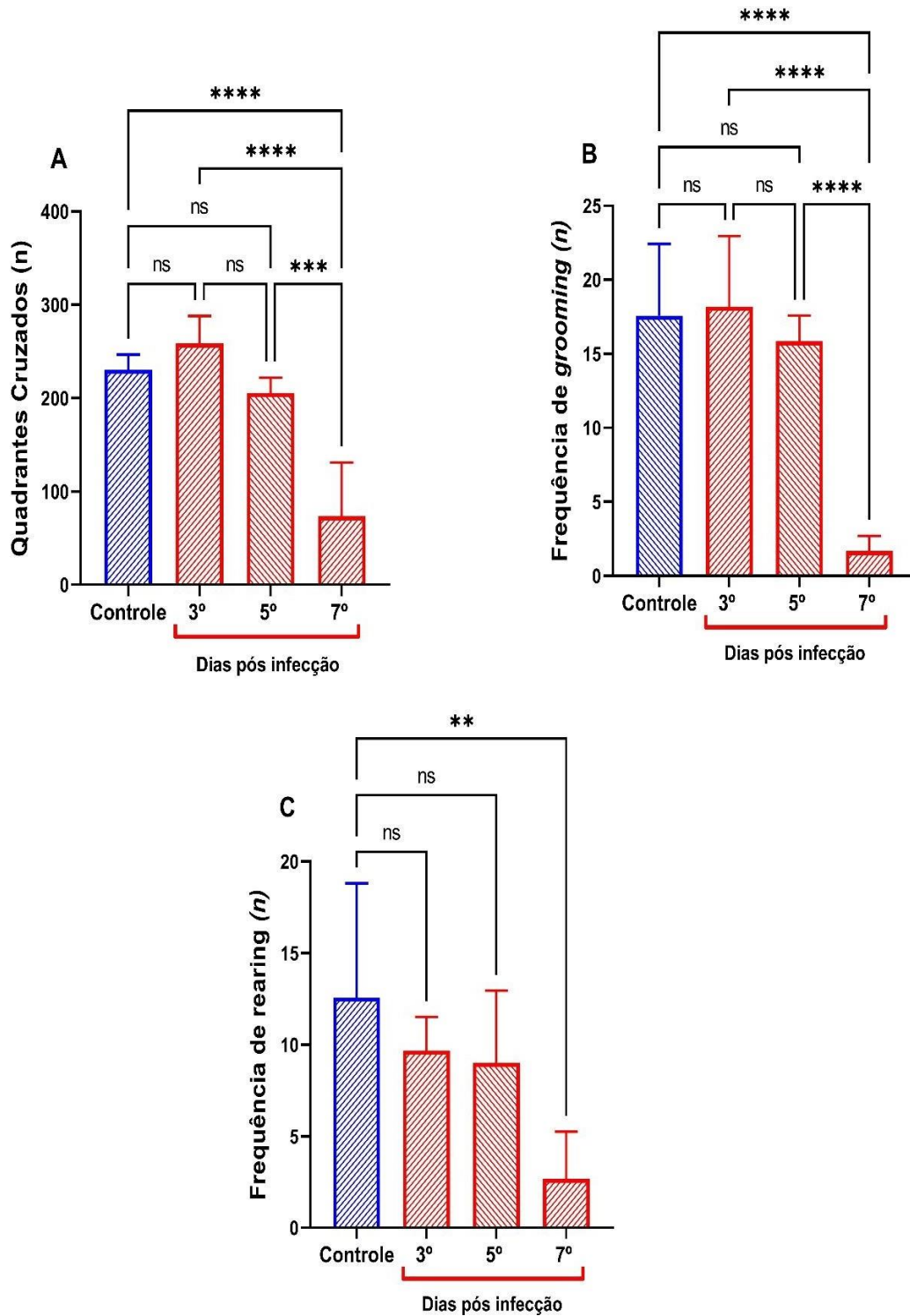
Além da análise da sobrevida e da parasitemia, conduziu-se à investigação de outros sinais neurológicos durante os diferentes estágios da MCE por meio do protocolo do *Rapid Murine Coma and Behavior Scale*. Essa análise nos dias 3, 5 e 7 após a infecção revelou um progressivo comprometimento nos parâmetros de coordenação, exploração, força e tônus muscular, higiene e autopreservação durante o curso da doença (Figura 9). No gráfico da Figura 9A, é possível observar que os animais infectados demonstraram déficits relacionados à coordenação motora em todos os dias analisados, destacando-se problemas na marcha e no equilíbrio. As alterações na performance motora, avaliadas pela exploração do aparato retangular, foram evidentes apenas no 7º dia após a infecção, conforme indicado na Figura 9B. Os parâmetros de força e tônus muscular revelaram prejuízos progressivos ao longo dos três dias de testes. Além disso, os animais infectados exibiram comprometimento nos reflexos de autopreservação e no comportamento de higiene, avaliado pela presença ou ausência de piloereção. Com esses parâmetros avaliados, pode-se perceber que a infecção com PbA foi capaz de induzir as alterações neurológicas esperadas durante o desenvolvimento da MCE (n = 10; CTRL =  $17,25 \pm 2,98$ ; 3º d.p.i =  $11,2 \pm 1,09$ ; 5º =  $12,4 \pm 0,54$ ; 7º =  $8 \pm 3,22$ ).



**Figura 9:** Alteração comportamental após inoculação da cepa PbA no 3º, 5º e 7º d.p.i. O comprometimento foi avaliado em cinco domínios diferentes: (A) coordenação, (B) performance motora, (C) tônus muscular e força, (D) reflexos e autopreservação e (E) comportamento tipo-higiene. A soma dos scores de todos os parâmetros foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n=6) e os dados estão expressos como média ± erro padrão. \*  $p < 0,005$ ; \*\*  $P < 0,001$ .



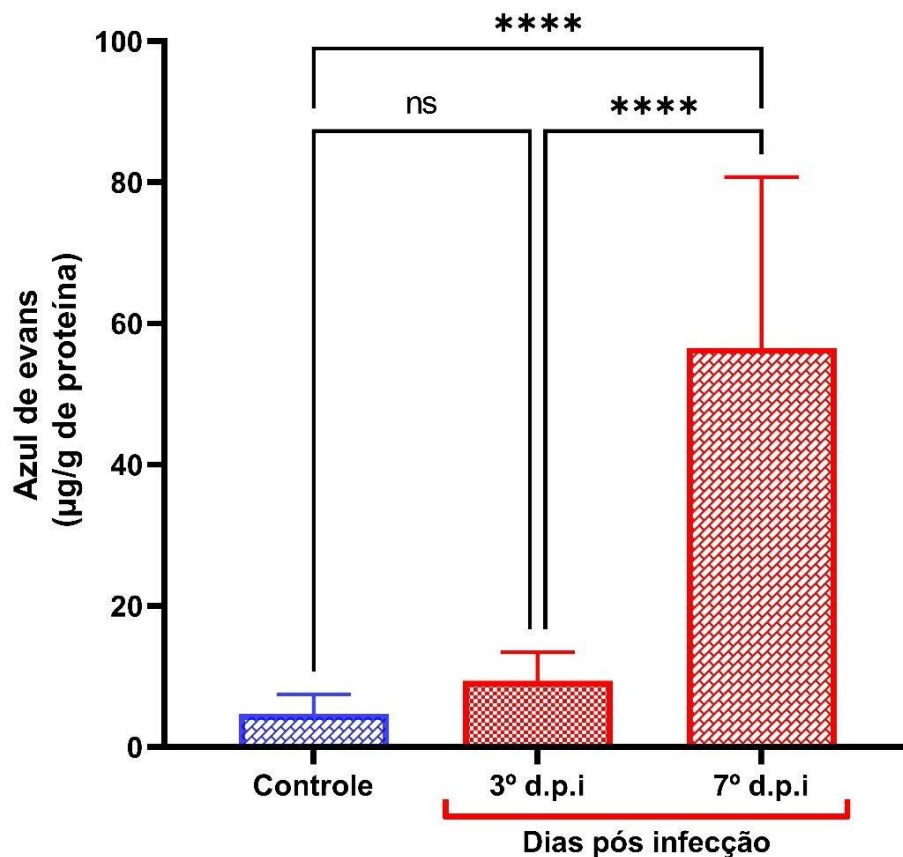
Prosseguindo com as análises comportamentais, os resultados obtidos por meio da aplicação do teste de campo aberto corroboraram as alterações motoras em animais infectados com a cepa PbA. Observações detalhadas dos gráficos apresentados na Figura 10 revelaram que o 7º dpi foi o ponto em que os parâmetros de locomoção (CTRL =  $230 \pm 40$ ; 3º =  $258 \pm 29$ ; 5º =  $205 \pm 16$ ; 7º =  $73 \pm 57$ ), *rearing* (CTRL =  $12 \pm 6$ ; 3º =  $9 \pm 4$ ; 5º =  $9 \pm 3$ ; 7º =  $2 \pm 2$ ) e *grooming* (CTRL =  $17 \pm 4$ , 3º =  $18 \pm 4$ ; 5º =  $15 \pm 4$ ; 7º =  $1 \pm 1$ ) demonstraram o maior impacto em relação ao grupo controle. Em contrapartida, durante o estágio inicial da infecção, representados pelo 3º e 5º d.p.i não foram observadas alterações significativas na performance motora desses animais, frisando a etapa crucial que o 7º d.p.i representa nas análises feitas a posteriori.



**Figura 10:** Alteração motora pelo teste do campo aberto após inoculação da cepa PbA no 3°, 5° e 7° d.p.i. O comprometimento foi avaliado em cinco domínios diferentes: A soma dos scores de todos os parâmetros foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n=6) e os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,005$ ; \*\*  $P < 0,001$ .

### 4.3. A MCE INDUZ QUEBRA DA BHE DURANTE O PERÍODO TERMINAL DA DOENÇA.

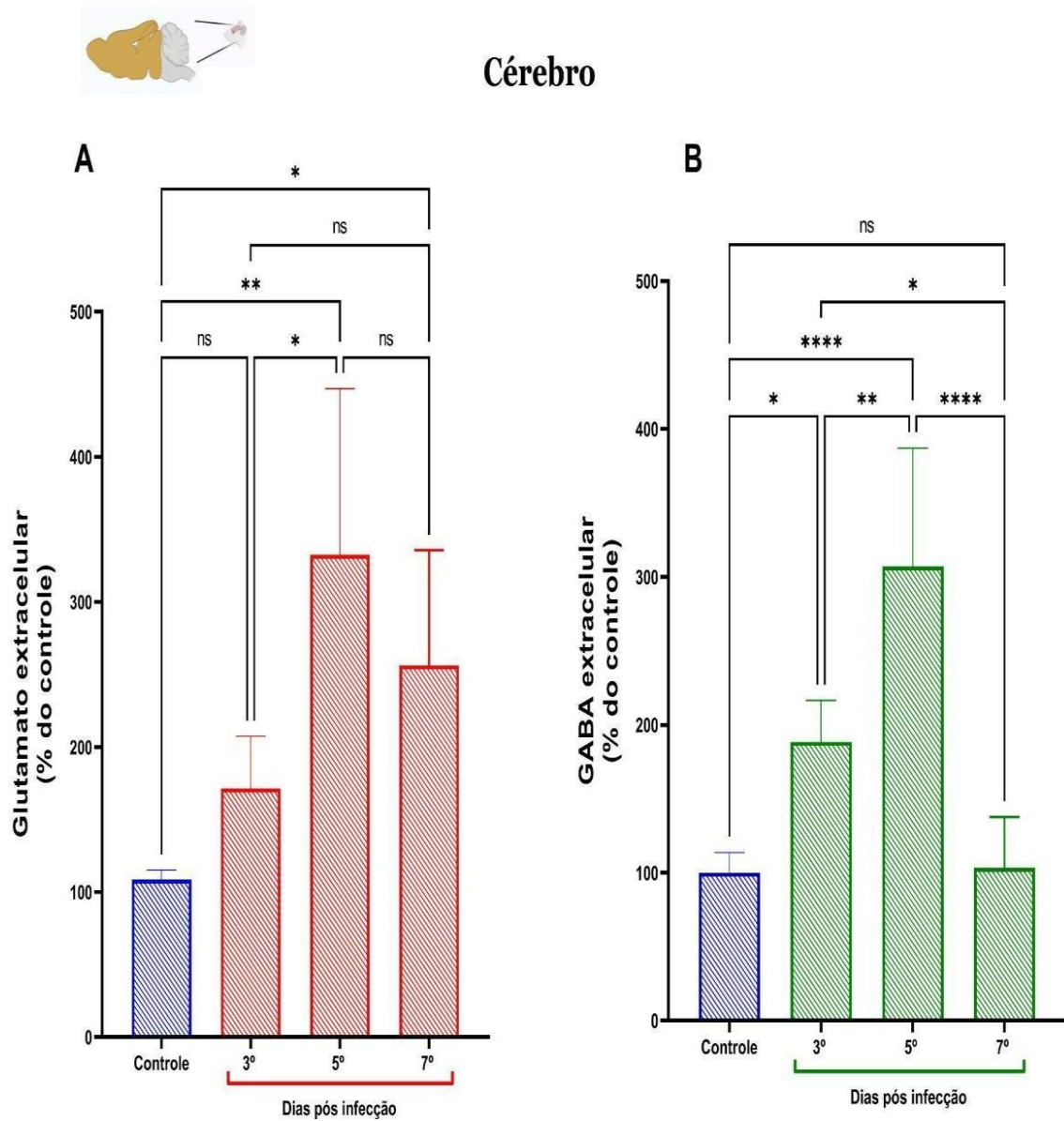
Seguindo com as avaliações de alterações provenientes do desenvolvimento da MCE, o ensaio de permeabilidade vascular com corante azul de Evans foi realizado nos animais experimentais a fim de acompanhar a integridade da barreira hematoencefálica ao longo da progressão da doença. Como ilustrado no gráfico da figura 11, a BBB permanece íntegra durante os primeiros estágios da doença, representados pelo dado do 3º d.p.i. (CTRL =  $4 \pm 2$ ; 3º =  $9 \pm 3$ ) Por outro lado, conforme previamente documentado na literatura, os resultados obtidos no 7º d.p.i. ( $7^\circ = 50 \pm 31$ ) indicam um aumento significativo na permeabilidade vascular. Esse fenômeno é evidenciado pela considerável alteração na quantidade de corante extraído do tecido coletado durante o período crítico do desenvolvimento da doença. Dessa forma, o dado mostra que a exposição do parênquima cerebral está presente durante o estágio crítico da MCE.



**Figura 11:** Avaliação do ensaio de permeabilidade vascular no 3º e 7º d.p.i. Quantificação do extravasamento de corante azul de Evans no parênquima cerebral de camundongos infectados com a cepa PbA, mostrando uma diferença significativa em comparação com o grupo controle no 7º d.p.i. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

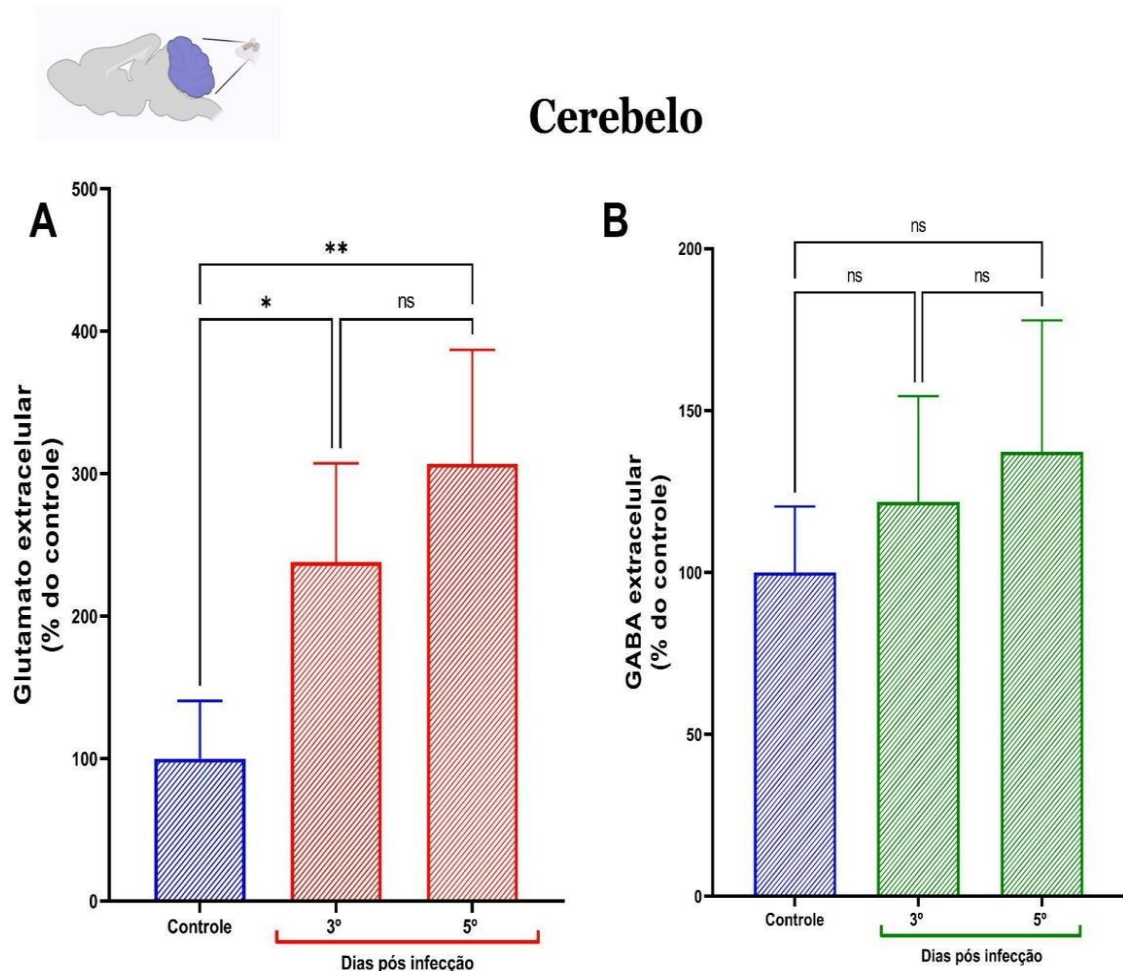
#### **4.4. ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO EXTRACELULAR DE GABA E GLUTAMATO ACOMPANHAM O DESENVOLVIMENTO DA MCE EM DIFERENTES REGIÕES DO SNC.**

Após a confirmação do estabelecimento de todos os parâmetros neurológicos e neurovasculares característicos da MCE, os cérebros dos animais infectados e dos controles foram coletados para a realização dos ensaios de liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato, com o objetivo de observar possíveis alterações nos níveis extracelulares dessas substâncias, que desempenham papel crucial no equilíbrio de excitação e inibição do SNC. Os dados coletados no 3° (CTRL= 100%±16%; PbA= 188%±27%), 5° (PbA= 332,59%±114,48%) e 7° dpi (PbA= 256,18%±79,56%), representados na figura 12A e expressos em porcentagem do controle, revelam um aumento significativo no conteúdo extracelular de glutamato em todos os dias de análise, quando comparado com o grupo controle não infectado. Paralelamente, o gráfico 12B indica que o GABA também registrou um aumento expressivo no 3° (CTRL= 100%±20%; PbA= %±32,7%) e 5° d.p.i (PbA= 302,9%±169%), seguido de um retorno aos níveis basais quando se aproxima do período crítico da doença, representado pelo 7° d.p.i. (PbA= 102,4%±22,8%).



**Figura 12:** Quantificação dos níveis extracelular de GABA e glutamato. A) Níveis extracelulares de glutamato no cérebro dos animais infectados com PbA ao longo do desenvolvimento da MCE. B) Mensuração dos níveis extracelulares de GABA no cérebro dos animais infectados com PbA ao longo do desenvolvimento da MCE. Os dados estão expressos em % do controle. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Seguindo com a mesma abordagem, o cerebelo dos animais infectados e dos controles foram coletados para a realização dos ensaios de liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato. Essa região é responsável principalmente pela atividade motora do organismo. Após a execução dos ensaios, os resultados obtidos e apresentados na figura 13A demonstram que, de forma semelhante ao que foi observado no cérebro dos animais infectados com PbA, altas concentrações extracelulares de glutamato podem ser quantificadas no 3° (CTRL= 100%±16%; PbA= 238,10%±69,15%) e 5° d.p.i (PbA= 306,94%±80,09%). No entanto, quando os níveis cerebelares de GABA foram quantificados, não foi observada nenhuma alteração no conteúdo do neurotransmissor inibitório durante os dias analisados, como mostrado na Figura 13B. (CTRL= 100%±20%; 3° d.p.i = 121,7%±32,7%; 5° d.p.i = 137,3%±40,5%)



**Figura 13:** Quantificação dos níveis extracelulares de GABA e glutamato no cerebelo. A) Níveis extracelulares de glutamato no cerebelo dos animais infectados com PbA em diferentes dias pós infecção. B) Níveis extracelulares de GABA no cerebelo dos animais infectados com PbA em diferentes dias pós infecção. Os dados estão expressos em % do controle. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

## 5. DISCUSSÃO

Sequelas neurológicas constituem um fator determinante na redução da qualidade de vida de cerca de 25% dos sobreviventes da malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, afetando sobretudo pacientes em estágios iniciais da vida (SCHIESS ET AL, 2022). A MC se manifesta como uma encefalopatia capaz de provocar alterações permanentes, incluindo episódios convulsivos, disfunções motoras como ataxia, além de mudanças neuro comportamentais e cognitivas associadas a distúrbios vasculares e processos inflamatórios evidenciados em análises *post-mortem* de pacientes diagnosticados com a complicação (BOIVIN et al, 2007; TELEANU et al, 2022). No entanto, devido às limitações intrínsecas da análise em tecido *post mortem* e à escassez de informações sobre os mecanismos celulares e bioquímicos provenientes do desenvolvimento da MC, estudos com modelos experimentais da doença têm sido conduzidos com o objetivo de aprofundar o entendimento sobre sua patogênese (GHANZAFARI ET AL, 2018; MARTINS ET AL, 2009).

Neste presente trabalho, buscou-se caracterizar se a progressão das alterações neurológicas na malária cerebral experimental induzida em camundongos albino suíço inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* poderia ser acompanhada por alterações nos níveis de neurotransmissores como GABA e glutamato em diferentes regiões do SNC. Os dados obtidos quanto à caracterização do modelo experimental da doença foram satisfatórios, uma vez que reproduziram o que já é bem estabelecido na literatura. Por meio dos gráficos da curva de sobrevivência, pode-se constatar que mais de 50% do grupo infectado com a cepa PbA evoluiu para óbito em decorrência da doença. Essa taxa de mortalidade era esperada uma vez que o modelo utilizado se mostra susceptível a todas as alterações neurológicas decorrentes da infecção (MARTINS ET AL, 2009; WHITE ET AL, 2010;).

Seguindo com o processo de caracterização do modelo, foram realizadas contagens de parasitemia a partir das distensões sanguíneas coletadas dos animais infectados com PbA ao longo da evolução de infecção e observadas por microscopia óptica. Os gráficos relacionados a essa análise revelaram um aumento progressivo da parasitemia após a inoculação, atingindo entre 15% e 20% no momento crítico da doença, quando os animais vêm a óbito em função das alterações neurológicas. A relevância desses dados é respaldada pela literatura, que associa o desenvolvimento da MCE a baixas porcentagens de parasitemia, diferenciando-se de um estado de hiperparasitemia (>60%) (OLIVEIRA ET AL, 2012; MARTINS ET AL, 2009).

Além disso, alterações na estrutura do vaso sanguíneo também são descritas na MCE, destacando-se a ruptura da barreira hematoencefálica (NISHANTH et al., 2019). Segundo a

literatura, essa quebra crucial, que controla o que atravessa do vaso para o tecido cerebral, ocorre nas fases terminais da progressão da doença, aproximadamente no 7º dia pós-infecção, conforme indicado pela curva de sobrevivência padronizada na MCE (ATAÍDE et al, 2021; OLIVEIRA et al., 2022). Os dados deste estudo corroboram essa observação, confirmando que a infiltração do conteúdo vascular para o parênquima cerebral ocorre nesse estágio da complicação, enquanto a integridade da barreira ainda pode ser observada no 3º d.p.i.

Para confirmar o desenvolvimento dos sinais neurológicos da MCE, todos os grupos experimentais foram submetidos a uma série de testes que compõem o RMCBS. Esse protocolo foi aplicado no 3º, 5º e 7º dia pós-infecção para avaliar prejuízos neurológicos relacionados à coordenação motora, comportamento exploratório, reflexos de autopreservação, força e tônus muscular, além do comportamento de higiene dos animais infectados com PbA. Os resultados mostraram que, já no 3º d.p.i., é possível observar mudanças nos parâmetros de comportamento de higiene dos animais infectados, enquanto os outros domínios apresentam alterações no 5º e, previsivelmente, no 7º d.p.i., em concordância com observações anteriores na literatura (MARTINS et al., 2009; CARROLL et al., 2010).

Além dos parâmetros analisados pelo RMCBS, o teste do campo aberto mostrou que o déficit cognitivo dos animais do grupo PbA foi acompanhado por uma redução no desempenho de marcha e locomoção, bem como em parâmetros importantes para a manutenção fisiológica dos animais, como autolimpeza e apoio sobre as patas traseiras, em comparação com o grupo controle no 7º d.p.i. Segundo Desruisseaux et al. (2008), a presença de crises convulsivas, ataxia e hemiparesia em animais infectados por PbA pode ser comparada às sequelas neurológicas observadas em humanos acometidos por MC, como paralisia cerebral, cegueira, surdez e déficits de aprendizagem. Essas observações reforçam a conclusão de que a indução da MCE, realizada para os propósitos deste estudo, foi capaz de desenvolver desordens neurológicas dentro do período experimental padronizado.

Com a quebra da BHE observada no 7º d.p.i, juntamente com os dados comportamentais que mostram alterações neurológicas acentuadas nesse mesmo período, ratifica-se a hipótese de que a exposição do parênquima cerebral é crucial para a patogênese da MCE. Estudos já mostraram o impacto que esse evento tem na progressão da doença (OLIVEIRA et al, 2022; ATAÍDE et al, 2021). Com base nessas observações, foram investigadas as alterações no parênquima cerebral por meio da quantificação de neurotransmissores importantes para a comunicação das células que compõem essa região.

Uma vez que todos esses aspectos essenciais para a caracterização da MCE foram minuciosamente verificados e respaldados pela literatura, procedemos com ensaios



bioquímicos para investigar se a doença estava acompanhada de distúrbios nos níveis de neurotransmissores cruciais para o sistema nervoso central: glutamato e GABA. Estudos anteriores têm destacado o papel central que esses neurotransmissores desempenham em diversas patologias que afetam o SNC (REDDY-THOOTKUR et al, 2022). O delicado equilíbrio entre excitação e inibição mediado pelo glutamato e pelo GABA é fundamental para a manutenção da homeostasia do sistema nervoso central. Alterações neste equilíbrio constituem o cerne das manifestações clínicas e das sequelas características da malária cerebral (OLIVEIRA et al, 2012; SARLO et al, 2021). Por conta disso, vem crescendo o interesse em entender como esses importantes sistemas de neurotransmissão respondem às alterações induzidas pelo desenvolvimento da doença.

Nesse presente trabalho, foi possível observar que o desenvolvimento da doença é acompanhado por alterações nos níveis extracelulares de GABA e glutamato não somente no cérebro como também no cerebelo, ao mesmo tempo em que as alterações neurológicas e vasculares estão sendo estabelecidas. Os dados obtidos neste estudo revelam que o glutamato apresenta concentrações elevadas no meio extracelular já a partir do 3º dia pós-inoculação (d.p.i), mantendo-se nesse estado até o 7º d.p.i tanto no cérebro quanto no cerebelo dos animais infectados com PbA. Estudos de Miranda et al (2010) já demonstraram anteriormente que o 7º d.p.i é marcado por um aumento expressivo do conteúdo de glutamato em análises de sinaptossomas extraídos do córtex cerebral de animais infectados com PbA.

Durante condições isquêmicas presentes no quadro de MC, altos níveis de glutamato presentes na fenda sináptica são associadas com alterações nos gradientes iônicos na membrana celular dos neurônios. Desse modo, o influxo exacerbado de  $Ca^{2+}$  para o interior do terminal axonal gera um aumento da liberação vesicular desse neurotransmissor. Ainda nesse panorama, prejuízos nos gradientes de  $Na^{+}$  e  $K^{+}$  principalmente podem ser relacionados com a reversão de transportadores de glutamato dependentes de  $Na^{+}$  (EAATs) potencializando o efluxo do aminoácido (SEARS & HEWETT, 2021).

Em concordância com essa ideia, outros trabalhos mostraram que a modulação farmacológica do sistema glutamatérgico com antagonistas de receptores NMDA de glutamato, MK-801, é capaz de atenuar as alterações neurológicas sem mexer necessariamente com o conteúdo de citocinas inflamatórias aumentadas na condição (DE MIRANDA et al, 2012). A atividade exacerbada de receptores NMDA é intrinsecamente relacionado com processos de morte celular em contextos de isquemia cerebral (LI et al, 2016; ZHOU et al, 2013). Os dados, apesar de escassos, sugerem uma participação crucial desse neurotransmissor na patogênese da doença, uma vez que a atenuação da sua atividade é capaz de melhorar a performance

neurológica mesmo apresentando alterações nos parâmetros inflamatórios. Entretanto, os trabalhos não analisaram essa alteração de conteúdo de neurotransmissores ao longo do desenvolvimento da doença e tampouco avaliaram essas alterações em outras regiões do SNC igualmente atingidas pelas consequências da infecção.

Além disso, observou-se um aumento no conteúdo extracelular do neurotransmissor inibitório GABA no 3º e 5º d.p.i. No entanto, no 7º d.p.i., período associado a crises convulsivas e à morte dos animais que desenvolvem a MCE, os níveis extracelulares do aminoácido retornaram aos níveis do grupo controle. Análises *in vitro* sugerem que a alta concentração extracelular de GABA em processos isquêmicos pode estar relacionada à reversão dos transportadores GAT expressos nos astrócitos, refletindo o aumento da captação de glutamato em situações em que o neurotransmissor também está presente em grande quantidade no meio extracelular, como é o caso deste estudo (HÉJA et al., 2009). Nessa perspectiva, experimentos precisam ser realizados para verificar se um possível comprometimento na captação de glutamato poderia levar ao retorno do GABA aos níveis basais observados no 7º d.p.i.

Por outro lado, são raros os dados na literatura que mostram alterações GABAérgicas durante o curso da MCE. Sharma et al. (1990) observaram uma correlação entre alterações na atividade do sistema GABAérgico e a evolução da parasitemia da MCE induzida pela infecção por *Plasmodium yoelii*. Embora existam estudos que associam alterações neuroquímicas à patogênese da malária cerebral, a escassez de dados e o fato de a maioria das análises focarem no período terminal da doença tornam as análises deste trabalho mais detalhadas quanto ao curso temporal. Essa análise minuciosa dos principais neurotransmissores do SNC em diferentes momentos da evolução da doença proporcionou uma compreensão inédita das alterações neuroquímicas, incluindo modificações em estágios iniciais da infecção.

A dosagem do conteúdo extracelular de GABA e glutamato no cerebelo mostrou que, enquanto o GABA não apresentou alterações nos dias pós-infecção analisados, o glutamato permaneceu em altas concentrações durante todo o curso da infecção. O cerebelo é uma das regiões afetadas tanto a nível estrutural quanto funcional na MC (SAKARIA et al., 2013). A perda de neurônios essenciais para a fisiologia cerebelar, como as células de Purkinje, está associada a desordens motoras, como a ataxia cerebelar, que afetam pacientes diagnosticados com MC (SRIRAM et al., 2013).

Alguns trabalhos mostram que danos cerebelares podem ser observados em modelos experimentais a partir da análise de comportamentos como de *grooming* (STRAZIELLE et al., 2012). Nossos dados mostram que o desequilíbrio entre GABA e glutamato acompanham alterações nesses parâmetros observados no RMCBS desde o 3º dpi, mostrando um possível

desarranjo motor em decorrências desses desajustes neuroquímicos. Esses achados destacam a importância de investigar as alterações neuroquímicas e estruturais em diferentes regiões do SNC para entender melhor a patogênese da malária cerebral e suas consequências neurológicas.

Outro aspecto dos dados obtidos que deve ser levado em consideração é o início precoce das alterações neuroquímicas observadas. Quando se retoma a análise sobre a permeabilidade da BHE, observa-se que a integridade dessa estrutura ainda estava preservada no 3º d.p.i. A exposição do parênquima cerebral ao conteúdo vascular tem sido amplamente associada ao desenvolvimento das alterações neurológicas da malária cerebral (ATAÍDE et al, 2021; OLIVEIRA et al, 2022). No entanto, nossos resultados sugerem que o parênquima cerebral é capaz de responder à infecção antes mesmo do extravasamento vascular ocorrer na região.

Por fim, essas descobertas destacam a complexidade e a dinâmica dos eventos neuroquímicos e estruturais que ocorrem durante a progressão da malária cerebral. Os dados deste estudo evidenciam a presença de um desequilíbrio nos níveis extracelulares de GABA/glutamato na malária cerebral experimental. As alterações na atividade gabaérgica, em contraste com a potencialização da neurotransmissão glutamatérgica, são associadas ao desenvolvimento de epilepsia, déficits comportamentais e cognitivos, sinais clínicos mais evidentes no 7º d.p.i da MCE induzida por PbA (WANG et al., 2010). A etiologia desse desequilíbrio pode envolver diversos fatores que ainda precisam ser investigados em maior profundidade, incluindo a liberação de glutamato induzida por processos isquêmicos, o aumento na reatividade de células gliais como astrócitos e micróglia, a atenuação da atividade dos transportadores do neurotransmissor ou um comprometimento no metabolismo de ambos.

## 6. CONCLUSÃO

Dessa forma, podemos concluir que as disfunções neurológicas decorrentes da malária cerebral experimental, induzida pela inoculação da cepa ANKA de *Plasmodium berghei*, podem estar ligadas a alterações no conteúdo extracelular dos neurotransmissores GABA e glutamato em estágios específicos do desenvolvimento da doença. Esses desarranjos neuroquímicos, delineados por este estudo, indicam uma participação crucial do sistema glutamatérgico e do sistema gabaérgico na patogênese da malária cerebral que ainda precisa ser cada vez mais elucidados. Desse modo, essas descobertas oferecem insights valiosos para a compreensão dos mecanismos subjacentes a essa condição e podem, potencialmente, direcionar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da malária cerebral.

## 7. REFERÊNCIAS

AKIDE NDUNGE, Oscar B. et al. Effects of anti- tau immunotherapy on reactive microgliosis, cerebral endotheliopathy, and cognitive function in an experimental model of cerebral malaria. *Journal of Neurochemistry*, v. 167, n. 3, p. 441-460, 2023.

AW, Ernest; ZHANG, Yingying; CARROLL, Michael. Microglial responses to peripheral type 1 interferon. *Journal of neuroinflammation*, v. 17, p. 1-13, 2020.

BIRBECK, Gretchen L. et al. Blantyre Malaria Project Epilepsy Study (BMPES) of neurological outcomes in retinopathy-positive paediatric cerebral malaria survivors: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, v. 9, n. 12, p. 1173-1181, 2010.

BOIVIN, Michael J. et al. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*, v. 119, n. 2, p. e360-e366, 2007.

BRIM, Rachel et al. Cognitive outcomes and psychiatric symptoms of retinopathy-positive cerebral malaria: cohort description and baseline results. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 97, n. 1, p. 225, 2017.

CARTER, J. A. et al. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 76, n. 4, p. 476-481, 2005.

CONROY, Andrea L. et al. Acute kidney injury is associated with impaired cognition and chronic kidney disease in a prospective cohort of children with severe malaria. *BMC medicine*, v. 17, p. 1-12, 2019.

CRAMER, Teresa et al. Cross-talk between GABAergic postsynapse and microglia regulate synapse loss after brain ischemia. *Science Advances*, v. 8, n. 9, p. eabj0112, 2022.

DANIYAN, Michael Oluwatoyin; FISUSI, Funmilola Adesodun; ADEOYE, Olufunso Bayo. Neurotransmitters and molecular chaperones interactions in cerebral malaria: Is there a missing link?. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 965569, 2022.

DESRUISSEAU, Mahalia S. et al. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *The Journal of infectious diseases*, v. 197, n. 11, p. 1621-1627, 2008.

DOROVINI-ZIS, Katerina et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *The American journal of pathology*, v. 178, n. 5, p. 2146-2158, 2011.

GETHING, Peter W. et al. Mapping *Plasmodium falciparum* mortality in Africa between 1990 and 2015. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 25, p. 2435-2445, 2016.

GHAZANFARI, Nazanin; MUELLER, Scott N.; HEATH, William R. Cerebral malaria in mouse and man. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 412582, 2018.

GIMENEZ, FBdLS et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 60, p. 1623-1635, 2003.

GITAU, E. N.; NEWTON, C. R. J. C. Blood–brain barrier in *falciparum* malaria. *Tropical Medicine & International Health*, v. 10, n. 3, p. 285-292, 2005.

HIJAZI, Mohamad et al. Malaria causing post-infectious cerebellitis, a case report and literature review. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 81, 2022.

IDRO, Richard et al. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Archives of disease in childhood*, v. 91, n. 2, p. 142-148, 2006.

JAIN, Vidhan et al. Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malaria journal*, v. 7, p. 1-15, 2008.

KIHARA, Michael et al. Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. *Malaria journal*, v. 8, p. 1-8, 2009.

LENNARTZ, Frank et al. Structure-guided identification of a family of dual receptor-binding PfEMP1 that is associated with cerebral malaria. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 3, p. 403-414, 2017.

LI, Victor; WANG, Yu Tian. Molecular mechanisms of NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications for neuroprotective therapeutics for stroke. *Neural regeneration research*, v. 11, n. 11, p. 1752-1753, 2016.

MARTINS, Yuri Chaves et al. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *International journal of experimental pathology*, v. 90, n. 2, p. 119-130, 2009.

MEDANA, Isabelle M.; CHAN- LING, Tailoi; HUNT, Nicholas H. Redistribution and degeneration of retinal astrocytes in experimental murine cerebral malaria: relationship to disruption of the blood- retinal barrier. *Glia*, v. 16, n. 1, p. 51-64, 1996.

Miranda, A. S., Vieira, L. B., Lacerda-Queiroz, N., Souza, A. H., Rodrigues, D. H., Vilela, M. C., ... & Teixeira, A. L. (2010). Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43, 1173-1177.

Miranda, A. S., Brant, F., Vieira, L. B., Rocha, N. P., Vieira, É. L. M., Rezende, G. H. S., ... & Teixeira, A. L. (2017). A neuroprotective effect of the glutamate receptor antagonist MK801 on long-term cognitive and behavioral outcomes secondary to experimental cerebral malaria. *Molecular neurobiology*, 54, 7063-7082.

NAGATAKE, Tsuyoshi et al. Pathology of falciparum malaria in Vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 47, n. 2, p. 259-264, 1992.

NISHANTH, Gopala; SCHLÜTER, Dirk. Blood–brain barrier in cerebral malaria: pathogenesis and therapeutic intervention. *Trends in parasitology*, v. 35, n. 7, p. 516-528, 2019.

NIYONAMBAZA, Shimwe Dominique et al. A review of neurotransmitters sensing methods for neuro-engineering research. *Applied sciences*, v. 9, n. 21, p. 4719, 2019.

OUMA, Benson J. et al. Plasma angiopoietin-2 is associated with age-related deficits in cognitive sub-scales in Ugandan children following severe malaria. *Malaria Journal*, v. 20, p. 1-10, 2021.

Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 3;3:17050.

PONSFORD, Mark J. et al. Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 205, n. 4, p. 663-671, 2012.

POSTELS, Douglas G. et al. Neurologic outcomes in retinopathy-negative cerebral malaria survivors. *Neurology*, v. 79, n. 12, p. 1268-1272, 2012.

REDDY-THOOTEKUR, Mounica; KRAGULJAC, Nina Vanessa; LAHTI, Adrienne Carol. The role of glutamate and GABA in cognitive dysfunction in schizophrenia and mood disorders—A systematic review of magnetic resonance spectroscopy studies. *Schizophrenia research*, v. 249, p. 74-84, 2022.

RIZO, Josep. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Science*, v. 27, n. 8, p. 1364-1391, 2018.

SAKARIA, Amit K. et al. Delayed cerebellar ataxia: a rare self limiting complication of *Plasmodium falciparum* malaria. *Advanced Biomedical Research*, v. 2, n. 1, p. 27, 2013.

SARLO, Gabrielle L.; HOLTON, Kathleen F. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure*, v. 91, p. 213-227, 2021.

SCHIESS, Nicoline et al. Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. *Malaria journal*, v. 19, p. 1-12, 2020.

SHARMA, M. C. et al. Effect of *Plasmodium yoelii* infection on GABA metabolism of mouse brain. *Experimental and molecular pathology*, v. 52, n. 2, p. 243-248, 1990.

SSENKUSU, John Mbaziira et al. Long-term behavioral problems in children with severe malaria. *Pediatrics*, v. 138, n. 5, p. e20161965, 2016.



STRAZIELLE, C. et al. Abnormal grooming activity in *Dab1<sup>scm</sup>* (scrambler) mutant mice. *Behavioural brain research*, v. 233, n. 1, p. 24-28, 2012.

TAYLOR, Terrie E. et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature medicine*, v. 10, n. 2, p. 143-145, 2004.

TELEANU, Raluca Ioana et al. Neurotransmitters—key factors in neurological and neurodegenerative disorders of the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 11, p. 5954, 2022.

TRIVEDI, Sweety; CHAKRAVARTY, Ambar. Neurological complications of malaria. *Current neurology and neuroscience reports*, v. 22, n. 8, p. 499-513, 2022.

VAN HUGTE, Eline JH; SCHUBERT, Dirk; NADIF KASRI, Nael. Excitatory/inhibitory balance in epilepsies and neurodevelopmental disorders: Depolarizing  $\gamma$ -aminobutyric acid as a common mechanism. *Epilepsia*, v. 64, n. 8, p. 1975-1990, 2023.

VARNEY, Nils R. et al. Neuropsychiatric sequelae of cerebral malaria in Vietnam veterans. *The Journal of nervous and mental disease*, v. 185, n. 11, p. 695-703, 1997.

WIJDICKS, Eelco FM; PARK, John G. Surviving cerebral malaria. *Neurology*, v. 91, n. 21, p. 978-979, 2018.

ZHOU, X. et al. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell death & disease*, v. 4, n. 3, p. e560-e560, 2013.

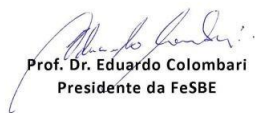
## ANEXO A – menção honrosa



### Certificado

#### Menção Honrosa

Certificamos que o trabalho intitulado **12.018 - GABAERGIC AND GLUTAMATERGIC DYSFUNCTION ASSOCIATED WITH NEUROLOGICAL DISORDERS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA**. Lima RMS, Silva MS, Martins LC, Mendes NSF, Ataíde BJA, Moura WJC, Penha LKRL, Moraes ;SAS, Passos ACF, Batista EJO, Silva AMHO, Oliveira KRHM, - Fisiologia - UFPA foi agraciado com **Menção Honrosa** durante a XXXVII Reunião Anual da FeSBE realizada no período 27 a 30 de agosto de 2023, no Hotel Atlântico Búzios, em Búzios, RJ.

  
 Prof. Dr. Eduardo Colombari  
 Presidente da FeSBE

Patrocinador



Apoio

