

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Departamento de Clínica Médica
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES COGNITIVAS E
COMPORTAMENTAIS COM PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MALÁRIA

Aline Silva de Miranda

Belo Horizonte

2011

Aline Silva de Miranda

ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES COGNITIVAS E
COMPORTAMENTAIS COM PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MALÁRIA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Infectologia e
Medicina Tropical da Faculdade
de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, para
obtenção do grau de mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior.

Coorientadora: Prof. Dr^a Milene Alvarenga Rachid

Belo Horizonte

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA

Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Renato de Lima dos Santos

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof^a. Anelise Impelziere Nogueira

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

SUB-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Prof. Ricardo de Amorim Corrêa

Stella Sala Soares Lima (Representante Discente)

À minha família, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mylene pelo carinho, dedicação e por não medir esforços para que suas filhas conquistem seus sonhos.

Ao meu pai, Abílio, pelo apoio e incentivo.

Às minhas queridas irmãs, Aléxia e Amanda, fundamentais na minha vida, por acreditarem e torcerem sempre por mim.

Aos meus avós, Lindorinha e Abílio, Nilce e Olvir (*in memoriam*), meus exemplos, pelo carinho, apoio, incentivo e por se alegrarem tanto com as conquistas de seus netos.

A todos os meus familiares, por sempre me apoiarem e me incentivarem. Um agradecimento especial ao tio Lalo pelos valiosos conselhos e por me inspirar a seguir a carreira acadêmica.

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira, meu orientador, pela confiança, pelas inúmeras oportunidades, pelo incentivo e conhecimento fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

À professora Milene Alvarenga Rachid, minha coorientadora, pela amizade, confiança, apoio, incentivo, gentileza e pela imensa ajuda, essencial para a realização deste trabalho.

À professora de graduação e hoje amiga, Vanessa Amaral Mendonça, pelo carinho, apoio, incentivo e acima de tudo por confiar em mim e me abrir inúmeras portas que me possibilitaram chegar até aqui.

Aos amigos do grupo de Neuroimunologia pela receptividade, incentivo e pelas colaborações e discussões tão valiosas, em especial:

À Marcinha, pela amizade, pelas valiosas conversas e pela imensa ajuda e troca de conhecimentos, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao David, pela amizade, pela paciência em me ensinar os primórdios das técnicas laboratoriais, por todas as nossas conversas científicas e filosóficas e pela grande colaboração na realização deste trabalho.

À Norinne, que com paciência e boa vontade me inseriu no “mundo” da malária e me ensinou aspectos importantes relacionados à teoria e a aplicação de técnicas laboratoriais essenciais para o estudo da doença e, portanto, para o desenvolvimento deste trabalho.

E à Natália e a Izabela, pela amizade, pelo apoio, incentivo e pelas boas conversas.

A todos os colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, pela receptividade, convivência e por toda ajuda.

Ao professor Mauro Martins Teixeira, chefe do Laboratório de Imunofarmacologia, pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Helton José dos Reis, pelo apoio e por permitir a utilização de seu laboratório para a realização dos experimentos de comportamento.

Aos professores Marcus Vinicius Gomes e Cristina Guatimosim, por permitirem a utilização do Laboratório de Medicina Molecular (INCT) para a análise da concentração de glutamato.

À Luciene Bruno Vieira, pela amizade, apoio, confiança, pela troca de conhecimento, pelas discussões valiosas, pela ajuda na análise da liberação de glutamato e por toda colaboração fundamental para realização deste trabalho.

À Alessandra Hubner Souza, pelo apoio e incentivo e por retirar com toda habilidade e paciência o líquido cefalorraquidiano dos camundongos para análise da concentração de glutamato.

Aos amigos do Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas pelo apoio e incentivo, em especial:

À Fátima, pela amizade, pela confiança, pelas conversas valiosas, pela troca de experiências e por toda ajuda.

À Lísia, pela amizade e por se preocupar comigo.

E à Andréia, pela amizade e alegria.

À professora Fabiana Simão Machado, pelo exemplo de profissionalismo, pela credibilidade, pelo apoio e incentivo.

À Thaís, a Lilian, a Carla e a Sílvia, por tornarem as disciplinas e a obtenção de créditos durante o mestrado mais agradáveis.

A todos os meus amigos, que longe ou perto, sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Um agradecimento especial ao Rômulo, por estar sempre ao meu lado desde o começo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

RESUMO

A malária é a principal e a mais grave doença parasitária da humanidade. A Malária cerebral (MC) tem sido definida como uma encefalopatia aguda, difusa, potencialmente reversível, caracterizada por coma e presença de formas assexuadas do *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo, com exclusão de outras causas de encefalopatias. Apresenta uma fisiopatologia complexa e pouco elucidada, na qual alterações vasculares, imunológicas e metabólicas têm sido descritas. No presente trabalho foi investigado possíveis associações entre alterações cognitivas e comportamentais e processos inflamatórios e neuroquímicos no sistema nervoso central (SNC) utilizando o modelo experimental de MC por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectados, intraperitonealmente, com a cepa PbA, por meio de inóculo padronizado (10^6 hemácias parasitadas). Alterações neurológicas e comportamentais significativas, avaliadas pela bateria de testes SHIRPA, foram encontradas no 6º dia após a infecção. Paralelamente às alterações encontradas nos domínios funcionais da bateria SHIRPA, foi observado aumento significativo da liberação de glutamato no córtex cerebral e da concentração de glutamato no líquido cefalorraquidiano dos camundongos infectados, mensurado por meio de um espectrofluorímetro. Além disso, os camundongos com MC apresentaram altos níveis de ansiedade no 5º dia após a infecção, indicados pela redução significativa da porcentagem de tempo gasto e do número de entradas realizadas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Associado aos transtornos de ansiedade foram observadas alterações histopatológicas em diferentes regiões do encéfalo, em especial na região CA1 do hipocampo, e aumento significativo nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no tecido cerebral dos camundongos infectados, avaliadas por meio da técnica ELISA. Dessa forma, os resultados encontrados sugerem que o glutamato pode desempenhar um importante papel na patogênese da MC e que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias no SNC, em especial IL-1 β e TNF- α , durante a infecção, pode contribuir significativamente para o desenvolvimento das alterações comportamentais observadas nos camundongos com MC.

Palavras-chave: Malária, Malária Cerebral, Alterações comportamentais, SHIRPA, Glutamato, Ansiedade, Citocinas pró-inflamatórias.

ABSTRACT

Malaria is the main and most serious parasitic disease of mankind. Cerebral Malaria (CM) has been defined as a potentially reversible diffuse encephalopathy characterized mainly by coma and the presence of asexual forms of *P. falciparum* parasites in peripheral blood smears in the absence of other causes of encephalopathy. This condition presents a complex and incompletely understood pathogenesis, in which vascular, immunological and metabolic changes have been described. In the present work were investigated possible associations between cognitive and behavioral alterations and neurochemical and inflammatory processes in the CNS using the *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) model of CM. Female C57BL/6 mice were infected with PbA by the intraperitoneal route (i.p), using a standardized inoculation of 10^6 parasitized red blood cells. Significant neurological and behavioral changes, as assessed by the SHIRPA battery, were found on day 6 post- infection. In parallel to the alterations found in the functional domains of the SHIRPA battery, were observed a significant increase of glutamate release in the cerebral cortex and of glutamate levels in the cerebrospinal fluid of infected mice, as measured by a spectrofluorimeter. Furthermore, CM mice presented high levels of anxiety on day 5 post-infection, as indicated by the significant decrease in the percentage of time spent on and in the number of entries made onto the open arms of the elevated plus maze. In association with the anxiety symptoms were observed histopathological changes in different brain regions, particularly in the CA1 region of hippocampus, and a significant increase of proinflammatory cytokine levels (IL-1 β and TNF- α) in the brain tissue of infected mice, as assessed by ELISA technique. Thus, our results suggest that glutamate may play an important role in the pathogenesis of CM and that the exacerbated production of proinflammatory cytokines in the CNS, especially IL-1 β and TNF- α , during the infection, could contribute significantly to the development of the behavioral alterations observed in CM mice.

Keywords: Malaria, Cerebral Malaria, Behavioral Changes, SHIRPA, Glutamate, Anxiety, Proinflammatory Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- ANOVA – Análise de variância
- BHE – Barreira hematoencefálica
- BSA – Soralbumina bovina (*Bovine Serum Albumine*)
- Ca²⁺ – Cálcio
- CEBIO – Centro de Bioterismo
- CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CSA – Sulfato de condroitina A
- DP – Desvio padrão
- dpi – Dias pós-infecção (*days post-infection*)
- EDTA – Ácido etil-diamino-tetra-acético
- ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- HE – coloração Hematoxilina-Eosina
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
- ICAM – Molécula de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecule*)
- IFN- γ – Interferon gamma
- KCl – Cloreto de potássio
- IL-1 β – Interleucina 1
- IL-4 – Interleucina 4
- IL-10 – Interleucina 10
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
- i.p. – Intraperitoneal
- LPS – Lipopolissacarídeo
- M – Molar
- MC – Malária cerebral
- μ L – Microlitro
- mg – Miligrama
- mM – Milimolar
- NaCl – Cloreto de sódio

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NK – Célula *Natural Killer*

nm – Nanômetro

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – O-fenilenediamina

PbA – *Plasmodium berghei* ANKA

PBS – Tampão fosfato de sódio (*Phosphate buffered saline*)

PECAM-1 – Molécula de adesão celular plaquetária/endotelial-1

PfEMP1 – Proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum*

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsufonila

r.p.m. – Rotações por minuto

SHIRPA – SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment

SNC – Sistema Nervoso Central

Th1 – Linfócito T *helper* tipo 1

Th2 – Linfócito T *helper* tipo 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 – Malária.....	1
1.2 - Fisiopatologia da malária	2
1.3 – Aspectos clínicos da malária	3
1.4 - Malária cerebral.....	4
1.5 – Fisiopatologia da malária cerebral.....	4
1.6 - Manifestações clínicas da malária cerebral	7
1.7 - Modelos experimentais de malária cerebral	15
1.8 – Alterações comportamentais e cognitivas em modelo murino de malária cerebral	17
1.9 – Resposta Imune e malária cerebral	18
1.10 – Processos Neuroquímicos e malária cerebral	22
2- JUSTIFICATIVA	25
3 - OBJETIVOS	26
3.1 - Objetivo geral	26
3.2 - Objetivos específicos	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 - Animais	27
4.2 - Parasito e infecção dos animais.....	27
4.3– Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais	27
4.4 – Histologia	31
4.5 - Medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no cérebro por ELISA.....	32
4.6 – Medida da liberação cortical de glutamato dependente e independente de Ca ²⁺	33
4.7 – Medida dos níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano.....	34
4.8 – Análise Estatística	35
5 – RESULTADOS	36
6- DISCUSSÃO	49
7 – CONCLUSÕES	54
8 – REFERÊNCIAS	55
ANEXO A	65

Introdução

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Malária

A malária é a principal e a mais grave doença parasitária da humanidade (Lou *et al.*, 2001). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2009), 108 países têm sido considerados endêmicos, sendo registrado no ano de 2008 um total de 243 milhões de casos, dos quais 863.000 evoluíram para o óbito. Considerada uma condição negligenciada e um relevante problema de saúde pública em mais de 90 países, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial está sob risco de transmissão da doença (Lou *et al.*, 2001). Os países da África Tropical respondem por mais de 90% dos casos clínicos e pela maioria dos casos letais, que ocorre principalmente entre crianças com idade inferior a cinco anos e primíparas residindo em áreas hiperendêmicas com limitado acesso aos serviços de saúde (Murphy e Breman, 2001).

Na América Latina, o maior número de casos (99%) tem sido registrado na Amazônia brasileira, incluindo os Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, com uma incidência anual de 400-700 mil casos (Ministério da Saúde, Brasil, 2005). No ano de 2009, o Brasil registrou 306.908 casos de malária, sendo 99,8% dos casos confirmados oriundos da Região Amazônica (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010).

Além dos transtornos associados à saúde, tem sido descrito importantes prejuízos sociais e econômicos em regiões endêmicas (Sachs e Malaney, 2002). Estima-se que no ano de 2009 foram gastos US\$ 1.7 bilhões de dólares em campanhas de prevenção e medidas de controle da doença (Organização Mundial de Saúde, 2009). Em adição, tem sido descrito uma redução anual de US\$ 12 bilhões de dólares no crescimento econômico de países africanos em decorrência dessa condição, o que tem contribuído significativamente para a permanente estagnação econômica destes países (Breman, 2001).

1.2 - Fisiopatologia da malária

Transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, a malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Quatro espécies têm sido descritas como agentes causadores da doença em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, sendo a primeira mais virulenta e a principal causadora de morte (De Souza e Riley, 2002). Recentemente, têm sido descritos casos de malária humana causada por uma quinta espécie de *Plasmodium*: *Plasmodium knowlesi*, uma espécie natural de primatas (White, 2008).

O *Plasmodium* é um parasito intracelular obrigatório e apresenta um complexo ciclo de vida que depende do mosquito vetor (hospedeiro invertebrado) e de um hospedeiro vertebrado (Bano *et al.*, 2007). Exibe notável complexidade biológica, com formas evolutivas apresentando diferentes características antigênicas e variado potencial patogênico, somado ao desenvolvimento de vários mecanismos de escape do parasito à ação do sistema imunológico (Good *et al.*, 2005).

Durante o repasto sangüíneo, o mosquito vetor inocula esporozoítos na derme do hospedeiro, que iniciam um processo de migração para o fígado, onde invadem os hepatócitos (Miller *et al.*, 2002). No interior dessas células, os esporozoítos sofrem esquizogonia tecidual e se diferenciam em merozoítos hepáticos. A formação de vesículas, denominadas merossomos, que se destacam de hepatócitos, garante uma liberação segura dos merozoítos para a circulação, evitando a fagocitose por macrófagos residentes (células de Kupffer) presentes em grande número nos capilares sinusóides hepáticos (De Souza e Riley, 2002). Desta forma, os merozoítos que chegam à circulação são capazes de invadir eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica da infecção, na qual ocorrem as manifestações clínicas que caracterizam a doença (Miller *et al.*, 2002). Ao invadir o eritrócito, iniciará uma fase cíclica

na qual progride para um trofozoíto e para esquizonte maduro, o qual rompe o eritrócito liberando novos merozoítos, que invadirão outros eritrócitos (de Souza e Riley, 2002).

Os sintomas clínicos da malária são, primariamente, decorrentes da ruptura de eritrócitos parasitados, já que nesta etapa ocorre a liberação na circulação sangüínea de antígenos constituintes do parasito e formados em conseqüência de seu metabolismo, que causam uma intensa ativação do sistema imune (Good *et al.*, 2005). Após vários ciclos sangüíneos ocorre a diferenciação em estágios sexuados, os gametócitos. Os gametócitos formados no homem são ingeridos pelo vetor durante a hematofagia. Dentro do mosquito, o parasito amadurece até alcançar o estágio sexual (fase esporogônica) onde, novamente, pode infectar o hospedeiro humano (Miller *et al.*, 2002).

É fundamental ressaltar que uma proporção significativa do ciclo de vida do *Plasmodium* ocorre dentro dos eritrócitos e, como estes não são contidos em um sítio tecidual específico, mecanismos imunes contra o parasito podem afetar vários órgãos (Good *et al.*, 2005).

1.3 – Aspectos clínicos da malária

Clinicamente, a malária manifesta-se por meio de uma diversidade de sintomas, que podem ser mais ou menos graves dependendo de fatores associados ao parasito e ao hospedeiro (Miller *et al.*, 2002). Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, predomina a forma não complicada da doença, caracterizada por febre intermitente, sudorese, mal estar, vômitos e intensa debilidade física. As infecções por *P. falciparum* podem levar a forma complicada, denominada malária grave, considerada uma doença multissistêmica, capaz de afetar diretamente o sistema nervoso central (SNC), causando déficits neurológicos e cognitivos que caracterizam a malária cerebral, além de anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório e acidose metabólica (Miller *et*

al., 2002; Mung'ala-odera *et al.*, 2004). Em adição, é fundamental ressaltar que o curso clínico da doença depende de fatores associados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, além de questões geográficas e sociais (Miller *et al.*, 2002).

1.4 - Malária cerebral

A malária cerebral (MC), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2000), pode ser definida como uma encefalopatia aguda, difusa, potencialmente reversível, caracterizada por coma e presença de formas assexuadas do *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo, com exclusão de outras causas de encefalopatias, principalmente meningite bacteriana e encefalites virais. Constitui a principal e mais grave complicação resultante da infecção pelo *P. falciparum*, sendo responsável pela maioria dos casos de incapacidade e óbito (Mung'ala-odera *et al.*, 2004; Idro *et al.*, 2005). Estima-se que em todo mundo ocorra anualmente 2,3 milhões de óbitos em decorrência dessa condição (Snow *et al.*, 2005) e que 10 a 17% dos que sobrevivem ao quadro de MC permanecem com algum déficit cognitivo e/ou comportamental (Murphy e Breman, 2001).

1.5 – Fisiopatologia da malária cerebral

Apesar de a fisiopatologia da MC ser amplamente investigada, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela sua patogênese permanecem pouco elucidados (Hunt *et al.*, 2006; Van de Heyde *et al.*, 2006). As alterações metabólicas causadas pelo bloqueio mecânico do fluxo sanguíneo cerebral decorrente do seqüestro de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas na microvasculatura e a ativação do sistema imune em resposta à infecção, com conseqüente secreção de mediadores inflamatórios (citocinas e

quimiocinas) pelo hospedeiro, têm sido descritos como os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da MC (Van de Heyde *et al.*, 2006).

O seqüestro de eritrócitos é um mecanismo complexo que envolve interações entre antígenos polimórficos localizados na superfície de eritrócitos infectados e receptores expressos nas células endoteliais do hospedeiro (De Souza e Riley, 2002). A proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum* (PfEMP1) é a principal molécula expressa na superfície dos eritrócitos infectados com estágios maduros do parasito, sendo capaz de reconhecer simultaneamente diversos receptores presentes nas células endoteliais do hospedeiro, incluindo CD36, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), sulfato de condroitina A (CSA), molécula de adesão celular plaquetária/endotelial-1 (PECAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), trombospondina e E-seletina (De Souza e Riley, 2002; Idro *et al.*, 2005). A ICAM-1 tem sido descrita como o principal ligante envolvido no seqüestro nos capilares cerebrais. Um aumento da expressão deste receptor no endotélio cerebral resultaria em citoaderência, cujos danos seriam responsáveis pelas complicações da MC, caracterizando a denominada hipótese da obstrução mecânica, postulada em 1894 por Marchiafava e Bignami (Miller *et al.*, 2002; Idro *et al.*, 2005). Acredita-se que o seqüestro acarreta uma obstrução do fluxo sanguíneo nos capilares cerebrais, reduzindo a perfusão tecidual e a remoção de metabólitos, levando à hipóxia e a conseqüentes danos no tecido e função cerebral (Van de Heyde *et al.*, 2006). Nesse contexto, a MC tem sido descrita também como uma desordem isquêmica e alguns estudos têm investigado o papel de mediadores neuroquímicos, incluindo o glutamato, e de outros compostos metabólicos como lactato e glicina na patogênese da MC (Sanni *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006).

Além da obstrução mecânica, a resposta imune exacerbada do hospedeiro à infecção pelo *P. falciparum* tem sido descrita como um importante evento na patogênese da MC (Hunt

e Grau, 2003; Armah *et al.*, 2007). Essa hipótese, conhecida como teoria da inflamação, postulada por Maegraith em 1948, sugere que a MC é resultado de uma resposta imune excessiva, que envolve inicialmente a ativação de células do sistema imune inata e de plaquetas em resposta aos antígenos do parasito (Hunt *et al.*, 2006; Van de Heyde *et al.*, 2006). Essa ativação do sistema imune acarretaria a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias tipo Th1, especialmente o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e o Interferon Gama (IFN- γ) e a ativação de células T (Hunt e Grau, 2003). A condição inflamatória resultante levaria a hiperexpressão de moléculas de adesão endotelial e a secreção de quimiocinas, contribuindo para a ocorrência do seqüestro de eritrócitos e a presença de plaquetas e células do sistema imune ativadas na microvasculatura cerebral do hospedeiro (Hunt *et al.*, 2006). A presença dessas células e de mediadores inflamatórios no microambiente vascular acarretaria em alterações na barreira hematoencefálica (BHE), hemorragia, apoptose de células endoteliais e astrócitos, danos neuronais, e consequentemente, os sintomas neurológicos (Van de Heyde *et al.*, 2006).

1.6 - Manifestações clínicas da malária cerebral

» Rev Bras Neurol, 46 (3): 35-41, 2010

Sintomas neurológicos agudos e residuais na malária

Acute and residual neurological symptoms in malaria

*Aline Silva de Miranda¹, Norinne Lacerda Queiroz²,
Milene Alvarenga Rachid³, Antônio Lúcio Teixeira⁴*

Sintomas neurológicos agudos e residuais na malária

Acute and residual neurological symptoms in malaria

*Aline Silva de Miranda*¹, *Norinne Lacerda Queiroz*²,
*Milene Alvarenga Rachid*³, *Antônio Lúcio Teixeira*⁴

Resumo

A malária é a principal e a mais grave doença parasitária no mundo. A infecção pelo Plasmodium falciparum é capaz de afetar diretamente o sistema nervoso central, causando déficits cognitivos e comportamentais que caracterizam a malária cerebral (MC). A MC é uma complicação decorrente da malária grave sendo responsável pela maioria dos casos de incapacidade e óbito. A ocorrência de seqüelas cognitivas e comportamentais após tratamento da MC tem sido descrita, principalmente em crianças. Adultos e crianças apresentam diferenças nas manifestações clínicas resultantes da MC. Geralmente, as crianças cursam com um espectro maior de alterações e apresentam déficits em vários domínios cognitivos após o tratamento da doença. Apesar da sua relevância clínica, os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento das seqüelas resultantes da MC permanecem pouco elucidados. O entendimento desses mecanismos é fundamental para elaboração de intervenções terapêuticas adequadas que atuem na prevenção desses transtornos.

Palavras-chave: malária, malária cerebral, seqüelas cognitivas, transtornos comportamentais

Abstract

Malaria is the main and most serious parasitic disease in the world. Plasmodium falciparum infection can affect directly the central nervous system leading to cognitive and behavioral impairment which characterize cerebral malaria (CM). CM is a complication of severe malaria being responsible for almost all disability and death. The occurrence of cognitive and behavioral impairment after treatment has been reported, especially in children. Adults and children have differences in clinical manifestations related to CM. In general, children tend to present a greater spectrum of symptoms and impairment in almost all domains of cognition after infection treatment. Despite of its clinical relevance, pathogenic mechanisms involved in the development of CM sequelae remain poorly understood. A better understanding of these mechanisms is essential for the elaboration of appropriate therapeutic interventions which may contribute to the prevention of CM sequelae.

Keywords: malaria, cerebral malaria, cognitive sequelae, behavioral disorders

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais.

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Professora do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Professor de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Endereço para correspondência:

Antônio Lúcio Teixeira
Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.
31270-901 Av. Antonio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil.
Tel/Fax: 31-3409-2651
E-mail: altextr@gmail.com

Introdução

A malária é a principal e a mais grave doença parasitária no mundo (Lou et al., 2001; De Souza & Riley, 2002). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (2000), a doença apresenta incidência anual de 250 a 500 milhões de casos, dos quais 1,5 a 2 milhões evoluem para o óbito. Considerada uma condição negligenciada e um relevante problema de saúde pública em mais de 90 países, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial está sob risco de transmissão da doença (Hunt et al., 2006; Armah et al., 2007). Os países da África Tropical respondem por mais de 90% dos casos clínicos e pela maioria dos casos letais, que ocorre principalmente entre crianças com idade inferior a cinco anos e primíparas residindo em áreas hiperendêmicas com limitado acesso aos serviços de saúde (Lou et al., 2001; Murphy & Breman, 2001). No ano de 2009, o Brasil registrou 306.908 casos de malária, sendo 99,8% dos casos confirmados oriundos da região amazônica (Ministério da Saúde, Brasil, 2009).

Transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, a malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Quatro espécies têm sido descritas como agentes causadores da doença em seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (De Souza & Riley, 2002; Ngoungou & Preux, 2008). As infecções por *P. falciparum* podem levar à forma complicada, denominada malária grave, considerada uma doença multissistêmica, capaz de afetar diretamente o sistema nervoso central (SNC), causando déficits neurológicos e cognitivos (Miller et al., 2002; Medana & Turner, 2006).

A malária cerebral (MC) constitui a principal e mais grave complicação resultante da infecção pelo *P. falciparum*, sendo responsável pela maioria dos casos de incapacidade e óbito (Opoka et al., 2009; Idro et al., 2005, Mung'ala-odera et al., 2004). Estima-se que em todo mundo ocorra anualmente 2,3 milhões de óbitos em decorrência dessa condição (Snow et al., 2005) e que 10 a 17% dos que sobrevivem ao quadro de MC permanecem com algum déficit cognitivo e/ou comportamental (Murphy & Breman, 2001).

Nesse estudo serão abordadas as principais manifestações clínicas da MC em crianças e adultos, bem como a ocorrência de seqüelas motoras, cognitivas e comportamentais após o tratamento da infecção.

Fisiopatologia da Malária Cerebral

A MC, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2000), pode ser definida como uma encefalopatia aguda, difusa, potencialmente reversível, caracterizada por coma e presença de formas assexuadas do *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo, com exclusão de outras causas de encefalopatias, principalmente meningite bacteriana e encefalites virais.

Apesar de a fisiopatologia da MC ser amplamente investigada, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela sua patogênese permanecem pouco elucidados (Medana & Turner, 2006; Armah et al., 2007). As alterações metabólicas causadas pelo bloqueio do fluxo sanguíneo cerebral decorrente do seqüestro de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas na microvasculatura e a ativação do sistema imune em resposta à infecção, com conseqüente secreção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) pelo hospedeiro, têm sido descritos como os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da MC (Van de Heyde et al., 2006; Lacerda-Queiroz et al., 2008; Pamplona et al., 2008).

A condição inflamatória resultante levaria à hiperexpressão de moléculas de adesão endotelial e à secreção de quimiocinas, contribuindo para o seqüestro de eritrócitos e a presença de plaquetas e células do sistema imune ativadas na microvasculatura cerebral do hospedeiro (Hunt et al., 2006). A presença dessas células e de mediadores inflamatórios no microambiente vascular levaria a alterações na barreira hematoencefálica, hemorragia, apoptose de células endoteliais e astrócitos, danos neuronais e, conseqüentemente, os sintomas neurológicos (Van de Heyde et al., 2006; Pamplona et al., 2008). Nesse sentido, um estudo recente do nosso grupo demonstrou associação temporal entre alterações dos parâmetros inflamatórios e comportamentais em modelo experimental de MC (Lacerda-Queiroz et al., 2010).

Manifestações Clínicas

A MC manifesta-se principalmente por alterações do nível de consciência, episódios de crises epiléticas, diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais (Newton et al., 2000; Idro et al., 2005, Mishra & Newton, 2009). Estudos têm correlacionado diferentes manifestações clínicas com achados histopatológicos de material post-mortem humano. Esses estudos têm demonstrado acúmulo de

eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, adesão endotelial ou acúmulo de leucócitos mononucleares e plaquetas nos capilares cerebrais, sinais morfológicos de ativação de astrócitos e microglia, presença de hemorragia no parênquima cerebral, lesão axonal e desmielinização, além de edema cerebral, principalmente no estágio final da doença (Newton et al., 2000; Hunt & Grau, 2003).

Embora contribuam para caracterização dos aspectos histopatológicos da MC, os estudos post-mortem apresentam limitações, pois não permitem a investigação dos mecanismos fisiopatológicos durante o curso da doença. Nesse contexto, o estudo em modelos experimentais de MC têm sido de grande relevância, uma vez que mimetizam grande parte das alterações clínicas descritas em humanos e permitem investigar fatores envolvidos na patogênese dessa condição (de Souza & Riley, 2002; Lacerda-Queiroz et al., 2010).

Embora diagnosticados pelos mesmos critérios, a MC apresenta-se de forma distinta em adultos e crianças. Algumas das principais diferenças clínicas entre adultos

e crianças com MC encontram-se descritas na Tabela 1. A idade e as características imunológicas têm sido descritas como as principais variáveis responsáveis pelas diferenças clínicas encontradas entre esses grupos (Idro et al., 2005).

Em estudo clínico, Sattar et al. (2009) avaliaram a ocorrência de alterações neurológicas em 100 pacientes adultos (média de idade entre 18 e 60 anos) com diagnóstico de MC. Nesse estudo, a alteração neurológica mais comum foi síndrome do neurônio motor superior, acometendo 61% dos avaliados. Além disso, anormalidades posturais foram encontradas em 10% dos pacientes, sendo que 6% cursaram com padrões de descerebração e 4% com padrões de decorticação. Dentre os 100 pacientes avaliados, 20% evoluíram para o óbito e os 80% restantes recuperaram-se completamente, não apresentando seqüelas neurológicas após a alta hospitalar.

A mortalidade em adultos é de aproximadamente 20%, podendo aumentar se a doença estiver associada a complicações clínicas. A maioria dos óbitos ocorre entre 24 e 48 horas após a admissão hospitalar e

Tabela 1. Diferenças clínicas entre crianças e adultos com malária cerebral (Modificado de Idro et al., 2005).

Manifestações Clínicas	Crianças	Adultos
Coma	Desenvolvimento rápido, freqüentemente após crises epiléticas	Desenvolvimento gradual, após episódios de sonolência, desorientação, agitação (delirium) por 2 a 3 dias ou ocorrência de crises epilética
Episódios de crise Epilética	> 60% apresentam episódio de crise epilética durante admissão hospitalar	20% apresentam episódio de crise epilética
Sinais neurológicos	Sinais neurológicos em > 30% associado a aumento da pressão intracraniana (PIC); alterações retinianas em > 60%; edema cerebral confirmado por tomografia computadorizada em 40%	Geralmente cursam com síndrome do neurônio motor superior; outros sinais neurológicos e alterações retinianas são menos comuns
Recuperação da consciência	Rápida: 24-48 horas após admissão hospitalar	Lenta: 48 horas após admissão hospitalar; alguns casos 1 semana
Mortalidade	18,6% a 75% dos óbitos ocorrem 24 horas após admissão hospitalar	20% a 50% dos óbitos ocorrem 24 horas após admissão hospitalar

frequentemente decorrem de falência pulmonar aguda, disfunção renal, choque ou hipóxia (Newton et al., 2000; Idro et al., 2005). A mortalidade depende da disponibilidade dos cuidados em saúde e os indivíduos que sobrevivem a um episódio de MC podem recuperar totalmente o nível de consciência dois dias após a admissão, entretanto, em alguns casos, essa recuperação pode ser mais lenta, demorando algumas semanas (Newton et al., 2000).

Malária Cerebral em Crianças

A MC em crianças manifesta-se, durante o coma, por diferentes sinais neurológicos tais como: síndrome do neurônio motor superior, posturas de descorticação ou descerebração, bruxismo, além de diferentes sinais de tronco cerebral. As alterações posturais parecem estar associadas com a elevação da pressão intracraniana, enquanto que a ausência dos reflexos de tronco, como o oculocefálico e o corneal, estaria relacionada com o aumento da mortalidade (Newton & Krishna, 1998; Idro et al., 2005). Episódios de crises epiléticas têm sido frequentemente descritos, ocorrendo após a admissão hospitalar em mais de 60% das crianças com MC (Idro et al., 2005; Martins et al., 2009). Múltiplos e prolongados episódios de crises epiléticas estão associados ao aumento da mortalidade e a ocorrência de seqüelas neurológicas (Newton & Krishna, 1998; Idro et al., 2005).

A mortalidade em crianças é de aproximadamente 20%, podendo aumentar se a doença estiver associada a complicações como hipoglicemia e acidose grave (Idro et al., 2005). A maioria dos óbitos ocorre nas primeiras 24 horas após início do tratamento e frequentemente decorrem de choque, falência respiratória, hipertensão intracraniana e acidose metabólica grave. Entretanto, a maior parte das crianças sobrevive à MC quando recebe tratamento apropriado, recuperando a consciência com 24 a 72 horas após início do tratamento (Newton et al., 2000).

Seqüelas Cognitivas e Comportamentais após Malária Cerebral

A ocorrência de seqüelas cognitivas e comportamentais após a resolução do quadro de MC tem sido amplamente reconhecida, principalmente em crianças (Carter et al., 2005b; Kihara et al., 2006; Boivin et al., 2007; John et al., 2008).

Segundo Murphy & Breman (2001), aproximadamente 19,2% dos indivíduos evoluem para o óbito em decorrência da MC e 10 a 17% daqueles que sobrevivem apresentam déficits neurológicos, mesmo após receberem tratamento adequado. As principais alterações clínicas persistentes em crianças incluem déficits motores (hemiparesia, quadriparesia, ataxia), alterações sensoriais (auditivas e visuais) e transtornos cognitivos (memória, atenção, linguagem) e comportamentais (Murphy & Breman, 2001; Mung'alo-odera et al., 2004). A permanência dessas complicações após a MC tem sido investigada principalmente por meio de estudos retrospectivos (Tabela 2). Ressalta-se que grande parte desses estudos investigou apenas aspectos cognitivos da MC, sendo limitado o número de publicações que discutem de forma sistemática os transtornos comportamentais associados a essa condição.

Boivin (2002) investigou, no Senegal, 29 crianças com histórico de MC e 29 controles de mesma idade e nível educacional. As crianças com histórico de MC apresentaram desempenho significativamente inferior nos testes de memória, atenção, linguagem e capacidade visual. Em estudo de coorte retrospectivo realizado no Quênia, Carter et al. (2005a, b) avaliaram 152 crianças com história de MC e 179 sem história de malária grave. As crianças com histórico de MC obtiveram desempenho inferior em todos os testes cognitivos realizados quando comparadas aquelas não expostas à doença.

Os estudos retrospectivos têm sido relevantes para identificar e confirmar a ocorrência de seqüelas cognitivas e comportamentais após a resolução do quadro de MC. Entretanto, esse tipo de estudo apresenta limitações, pois não permite o acompanhamento da evolução das complicações resultantes da MC, não avaliando os fatores sociais e ambientais que podem interferir no desenvolvimento das disfunções cognitivas ao longo do tempo (John et al., 2008). Nesse contexto, alguns estudos prospectivos e/ou longitudinais têm sido realizados (Tabela 2).

Boivin et al. (2007), ao avaliarem 44 crianças com histórico de MC, entre 5 e 12 anos de idade, identificaram déficits cognitivos seis meses após o tratamento da doença em 21,4% das crianças. Em um estudo posterior nesta mesma população, John et al. (2008) demonstraram que, após dois anos de resolução da MC, 26,3% das crianças avaliadas mantiveram ou desenvolveram complicações cognitivas. Apesar do

Tabela 2. Estudos que investigaram a permanência de alterações cognitivas, motoras e comportamentais após resolução do quadro de Malária Cerebral.

Autor / Ano	País	População (anos)	Descrição Clínica	Critério Diagnóstico	Nº de Casos	Controle	Seguimento (meses)	Desenho	Tipos de Sequelas Descritas
Boivin (2002)	Senegal	5 a 12	MC	Critério da OMS para MC	29	29	± 36	Caso-Controle	Alterações Visuais, de linguagem; memória e atenção
Carter et al. (2005a, b)	Quênia	6 a 10	MC	Escala de Coma de Blantyre ≤ 2	152	179	>24	Coorte	Alterações Visuais, auditivas, de linguagem; memória, atenção e comportamento
Carter et al. (2006)	Quênia	6 a 10	MC	Escala de Coma de Blantyre ≤ 2	152	179	>24	Coorte	Alterações em diferentes aspectos da linguagem
Idro et al. (2006)	Quênia	6 a 9	MC	Critério da OMS para MC	143	179	20	Coorte	Alterações de linguagem; memória, atenção, comportamento e função motora
Boivin et al. (2007)	Uganda	5 a 12	MC	Critério da OMS para MC	44	89	6	Coorte	Alterações de memória, prospectivo atenção e aprendizado
John et al. (2008)	Uganda	5 a 12	MC	Critério da OMS para MC	44	89	24	Coorte prospectivo	Alterações de memória, atenção e aprendizado
Opoka et al. (2009)	Uganda	3 a 12	MC	Critério da OMS para MC	82	105	24	Coorte prospectivo	Hiperreflexia, hipertonia, quadriparesia, alterações visuais, auditivas e de atenção

MC: malária cerebral; OMS: Organização Mundial de Saúde.

crescente interesse em avaliar as alterações cognitivas resultantes da MC a longo prazo, os diferentes métodos empregados e as distintas definições da doença têm dificultado a comparação dos resultados obtidos (Mung'ala-odera et al., 2004). Ainda, poucos estudos investigaram os fatores responsáveis pelo desenvolvimento das seqüelas cognitivas subseqüentes à MC (John et al., 2008).

Permanece pouco esclarecido se a ocorrência de seqüelas cognitivas é decorrente do quadro de MC grave ou derivada de um mecanismo patológico distinto (Martins et al., 2009). Alguns fatores durante a MC podem aumentar a probabilidade de a criança permanecer com alterações cognitivas e comportamentais mesmo após resolução da doença. Dentre esses fatores estão: histórico de crises epiléticas, aumento da pressão intracraniana, coma profundo e prolongado, hipoglicemia, presença de múltiplas crises

epiléticas durante a hospitalização, anemia grave e presença de déficits neurológicos no momento da alta hospitalar. A ocorrência de múltiplas crises epiléticas, coma e perda prolongada da consciência parecem ser os principais fatores para predizer as alterações cognitivas permanentes após a MC (Idro et al., 2006).

Apesar da ocorrência de seqüelas cognitivas serem amplamente descritas em crianças após a resolução da MC, a real prevalência dessas alterações em adultos permanece pouco conhecida devido à ausência de estudos longitudinais nessa população (Mishra & Newton, 2009). A incidência de seqüelas cognitivas e comportamentais em adultos (5%) parece ser menor que a observada em crianças (10-28%). Além disso, as seqüelas em adultos diferem daquelas observadas em crianças. Após resolução do quadro de MC, adultos tendem a cursar com neuropatias cranianas, sinais piramidais, além de epilepsia focal, sinais subclínicos da

síndrome de ansiedade-depressão e mesmo depressão e mudanças de personalidade (Newton & Krishna, 1998; Martins et al., 2009).

Considerações Finais

A malária resultante da infecção pelo *P. falciparum* está associada a transtornos cognitivos e comportamentais que caracterizam a MC e se manifestam durante o curso da doença e após a resolução da mesma (Kihara et al., 2006). A infecção pelo *P. falciparum* tem sido descrita como uma das principais causas de incapacidade em áreas endêmicas a malária, ocasionando elevados custos com recursos em saúde e conseqüentes prejuízos no desenvolvimento econômico dessas regiões (Mung'ala-odera et al., 2004). A maior parte das seqüelas cognitivas descritas nessa revisão permanece por um longo período de tempo, acarretando prejuízos na qualidade de vida dos pacientes e elevados gastos em saúde.

As alterações cognitivas e comportamentais resultantes da MC ocorrem de forma distinta em crianças e adultos. As crianças geralmente cursam com uma diversidade de manifestações clínicas e apresentam déficits em diferentes domínios cognitivos após resolução da doença (Kihara et al., 2006). Estudos retrospectivos e longitudinais têm confirmado a ocorrência de seqüelas cognitivas em crianças expostas a MC, entretanto, poucos estudos têm sido realizados na população adulta.

Os estudos descritos nessa revisão demonstram que a MC está associada à ocorrência de complicações cognitivas e comportamentais, especialmente em crianças. Apesar da relevância clínica e econômica, os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento dessas seqüelas após resolução do quadro de MC permanecem pouco elucidados. Estudos futuros que investiguem a patogênese dos transtornos cognitivos e comportamentais resultantes da MC são fundamentais para elaboração de intervenções terapêuticas adequadas que atuem na prevenção dos mesmos

Agradecimentos

O presente estudo recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. Armah, H. B.; Wilson, N. O.; Sarfo, B. Y.; Powell, M. D.; Bond, V. C.; Anderson, W.; Adjei, A. A.; Gyasi, R. K.; Tettey, Y.; Wiredu, E. K.; Tongren, J. E.; Udhayakumar, V.; Stiles, J. K. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J*, 2007. 6: 147-164.
2. Boivin, M. J. Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in senegalese children. *J Dev Behav Pediatr*, 2002. 23: 353-364.
3. Boivin, M. J.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R. O.; Idro, R.; Jurek, A. M.; John, C. C. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. *Pediatrics*, 2007. 119: e360-e366.
4. Carter, J. A.; Ross, A. J.; Neville, B. G. R.; Obiero, E.; Katana, K.; Mung'ala-Odera, V.; Lees J. A.; Newton, C. R. J. C. Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Trop Med Int Health*, 2005a. 10: 3-10.
5. Carter, J. A.; Mung'ala-Odera, V.; Neville, B. G. R.; Murira, G.; Mturi, N.; Musumba, C.; Newton, C. R. J. C. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005b. 76: 476-481.
6. Carter, J. A.; Lees, J. A.; Gona, J. K.; Murira, G.; Rimba, K.; Neville, B. G. R.; Newton, C. R. J. C. Severe falciparum malaria and acquired childhood language disorder. *Dev Med Child Neurol*, 2006. 48: 51-57.
7. De Souza, J. B.; Riley, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*, 2002. 4: 291-300.
8. Hunt, N. H.; Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, 2003. 24: 491-499.
9. Hunt, N. H.; Golenser, J.; Chan-Ling, T.; Parekh, S.; Potter, C. R. S.; Medana, I. M.; Miu, J.; Ball, H. J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*, 2006. 36: 569-582.
10. Idro, R.; Carter, J. A.; Fegan, G.; Neville, B. G. R.; Newton, C. R. J. C. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Arch Dis Child*, 2006. 91: 142-148.
11. Idro, R.; Jenkins, N. E.; Newton, C. R. J. C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*, 2005. 4: 827-40.
12. John, C. C.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R. O.; Idro, R.; Jurek, A. M.; Wu, B.; Boivin, M. J. Cerebral Malaria in Children Is Associated With Long-term Cognitive Impairment. *Pediatrics*, 2008. 122: e92-e99.
13. Kihara, M.; Carter, J. A.; Newton, C. R. J. C. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health*, 2006. 11: 386-397.

14. Lacerda-Queiroz, N.; Rodrigues, D. H.; Vilela, M. C.; Miranda, A. S.; Amaral, D.C.G.; Camargos, E. R. S.; Carvalho, L. J. M.; Howe, C. L.; Teixeira, M. M.; Teixeira, A. L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol*, 2010. 125: 271–278.
15. Lacerda-Queiroz, N.; Teixeira, M. M.; Teixeira, A. L. Imunopatogenênese da Malária Cerebral. *Rev Bras Neurol*, 2008. 44: 13-19.
16. Lou, J.; Lucas, R.; Grau, G. E. Pathogenesis of Cerebral Malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev*, 2001. 14: 810–820.
17. Martins, Y. C.; Carvalho, L. J. M.; Daniel-Ribeiro, C. T. Challenges in the Determination of Early Predictors of Cerebral Malaria: Lessons from the Human Disease and the Experimental Murine Models. *Neuroimmunomodulation*, 2009. 16: 134–145.
18. Medana, I. M.; Turner, G. D. H. Human cerebral malaria and the blood–brain barrier. *Int J Parasitol*, 2006. 36: 555–568.
19. Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002. 415: 673-679.
20. Ministério da Saúde, 2009. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>
21. Mishra, S. K.; Newton, C. R. J. C. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol*, 2009. 5: 189–198.
22. Mung'ala-odera, V.; Snow, R. W.; Newton, C. R. J. C. The burden of the neurocognitive impairment associated with plasmodium falciparum malaria in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 2004. 71: 64–70.
23. Murphy, S. C.; Breman, J. G. Gaps in the childhood malaria burden in africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. 64: 57–67.
24. Newton, C. R. J. C.; Hien, T. T.; White, N. Neurological aspects of tropical disease: cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2000. 69: 433–441.
25. Newton, C. R. J. C.; Krishna, S. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*, 1998. 79: 1–53.
26. Ngoungou, E. B.; Preux, P. M. Cerebral malaria and epilepsy. *Epilepsia*, 2008. 49: 19–24.
27. Opoka, R. O.; Bangirana, P.; Boivin, M. J.; John, C. C.; Byarugaba, J. Seizure activity and neurological sequelae in Ugandan children who have survived an episode of cerebral malaria. *Afr Health Sci*, 2009. 9: 75-81.
28. Pamplona, A.; Hanscheid, T.; Epiphanyo, S.; Mota, M. M.; Vigário, A. M. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: Shedding new light on an old disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 41: 711-716.
29. Sattar, M. A.; Hoque, H. W.; Amin, M. R.; Faiz, M. A.; Rahman, M. R. Neurological findings and outcome in adult cerebral malaria. *Bangladesh Med Res Counc Bull*, 2009. 35: 15-17.
30. Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2005. 434: 214–217.
31. Van de Heyde, H. C.; Nolan, J.; Combes, V.; Gramaglia, I.; Grau, G. E. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*, 2006. 22: 503-508.
32. World Health Organization (WHO). Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000. 94: 1–90.

1.7 - Modelos experimentais de malária cerebral

Devido às dificuldades em acompanhar casos de MC humana e a limitada possibilidade de examinar os processos patológicos, alguns modelos experimentais de MC foram desenvolvidos (Combes *et al.*, 2005). O modelo experimental com primatas apresenta características muito similares às descritas na MC humana, em especial o seqüestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral e a ocorrência de complicações vasculares como hemorragias. Entretanto, esse modelo apresenta importantes limitações em relação à dificuldade em determinar o início dos sinais clínicos, a baixa incidência de casos, alto custo e a ausência de animais geneticamente modificados, o que dificulta o estudo e a compreensão dos eventos celulares e moleculares responsáveis pelas alterações cerebrais (Lou *et al.*, 2001).

O modelo experimental utilizando roedores é bem caracterizado e útil para a pesquisa científica. A grande diversidade de linhagens de camundongos associada à infecção com diferentes espécies de *Plasmodium* (*P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. vinckei*) têm contribuído para elucidar mecanismos envolvidos na patogênese da doença (De Souza e Riley, 2002). A maioria dos estudos provém do modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), que apresenta uma divisão segura entre linhagens de camundongos resistentes (BALB/c e A/J) e susceptíveis (C57Bl/6 e CBA). Há evidências de que os camundongos susceptíveis apresentam importantes alterações morfológicas cerebrais, como ativação de células endoteliais e micróglia (De Souza e Riley, 2002; Lackner *et al.*, 2006; Desruisseaux *et al.*, 2008) e desenvolvam sinais neurológicos típicos da MC humana como paralisia, convulsão e coma, evoluindo para o óbito geralmente entre o oitavo e o décimo dia após a infecção (Hunt e Grau, 2003; Combes *et al.*, 2005). Em contrapartida, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferente ao parasito, não desenvolvem MC e morrem, aproximadamente, 20 dias após a infecção devido à anemia grave e hiperparasitemia (De Souza e Riley, 2002).

O modelo de MC utilizando a cepa PbA apresenta boa reprodutibilidade e mimetiza importantes alterações imunológicas, histopatológicas, metabólicas e clínicas encontradas na MC humana (Lou *et al.*, 2001; De Souza e Riley, 2002). Nos últimos 20 anos, esse modelo tem sido amplamente empregado no estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da MC bem como na investigação de possíveis alvos terapêuticos (De Souza e Riley, 2002). Entretanto, é fundamental ressaltar que o modelo murino de MC, como grande parte dos modelos, não é capaz de reproduzir todas as características observadas na MC humana, apresentando diferenças significativas que devem ser consideradas ao se extrapolar os resultados obtidos com esse modelo. No modelo murino, o leucócito é o tipo celular predominantemente seqüestrado na microcirculação cerebral de camundongos, e não os eritrócitos, como na MC humana (Lou *et al.*, 2001; De Souza e Riley, 2002; White *et al.*, 2010). Embora essa diferença seja consenso entre a maioria dos autores, em estudo recente Batista *et al.*, (2010) demonstraram que o desenvolvimento da MC em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com PbA depende também do acúmulo de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral. Esse trabalho fornece evidências importantes de que o modelo de MC utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com PbA apresenta similaridades significativas com a MC humana podendo ser ideal para o estudo dessa condição. Além disso, o modelo experimental murino apresenta vantagens técnicas como à disponibilidade de diferentes ferramentas genéticas (animais knockout) e moleculares que facilitam a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da MC (Hunt e Grau, 2003).

1.8 – Alterações comportamentais e cognitivas em modelo murino de malária cerebral

Os modelos experimentais de MC, utilizando linhagens de camundongos susceptíveis, são capazes de mimetizar sinais neurológicos típicos da MC humana como ataxia, paralisia, convulsão e coma (Hunt e Grau, 2003; Combes *et al.*, 2005). Esses sinais clássicos da MC têm sido avaliados em grande parte dos estudos experimentais de forma subjetiva, geralmente por observação e não pela utilização de testes específicos e padronizados (Lackner *et al.*, 2006; Desruisseaux *et al.*, 2008). Além disso, as alterações cerebrais na MC humana e experimental são difusas e abrangem diferentes regiões do cérebro, como hipocampo, cerebelo e tronco encefálico, reconhecidamente importantes em funções mais específicas como memória e aprendizado (Kihara *et al.*, 2006; Boivin *et al.*, 2007; Desruisseaux *et al.*, 2008). Nesse contexto, apenas alguns estudos utilizando modelos experimentais de MC têm investigado de forma sistemática, por meio de testes padronizados e validados, as diferentes alterações cognitivas e comportamentais que caracterizam essa condição e correlacionado com achados histopatológicos e imunológicos (Lackner *et al.*, 2006; Desruisseaux *et al.*, 2008; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010). Em um estudo conduzido por Lackner *et al.* (2006), foi investigado por meio de uma bateria padronizada de testes (SHIRPA) diferentes alterações comportamentais e neurológicas em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com PbA. Foram encontradas, no 6º dia após a infecção, alterações significativas em todos os parâmetros avaliados em associação com mudanças histopatológicas em diferentes regiões do cérebro. Utilizando a mesma bateria de testes, em estudo recente, Lacerda-Queiroz *et al.* (2010) demonstraram que o aumento de mediadores inflamatórios no tecido cerebral de camundongos infectados com PbA antecedeu as alterações neurológicas e comportamentais observadas. Camundongos que desenvolveram MC após infecção com a cepa PbA apresentaram déficits cognitivos significativos no teste de reconhecimento de objetos associados a áreas de inflamação e hemorragia em diferentes regiões cerebrais (Desruisseaux

et al., 2008). Em associação, esses estudos fornecem evidências de que a gravidade e a progressão da doença são determinadas por diferentes parâmetros clínicos que devem ser investigados por meio de testes padronizados e específicos.

1.9 – Resposta Imune e malária cerebral

A MC é uma condição neuroinflamatória que depende da resposta imune do hospedeiro à infecção (Hunt *et al.*, 2006). O envolvimento de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas e de células efetoras do sistema imune na patogênese da MC humana e experimental tem sido amplamente reconhecido (Hunt e Grau, 2003; Van de Heyde *et al.*, 2006). Há evidências de que a presença do parasito e de toxinas produzidas por ele é capaz de ativar o sistema imune inato do hospedeiro e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos ativados (Neb *et al.*, 2005). A produção de citocinas durante a infecção é fundamental para o controle da parasitemia, entretanto, quando excessiva pode ocasionar danos significativos ao SNC (Adams *et al.*, 2002; De Souza e Riley, 2002). Em estudos clínicos e experimentais o aumento significativo das concentrações de citocinas pró-inflamatórias periféricas e localizadas no SNC, principalmente TNF- α , IFN- γ e Interleucina-1 (IL-1 β), tem sido associado às alterações neurológicas observadas na MC (Jennings *et al.*, 1997; Medana *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999; Armah *et al.*, 2005).

O SNC é considerado um sítio imunologicamente privilegiado, possuindo uma limitada reatividade imune e inflamatória em decorrência da presença da BHE, composta por junções intercelulares especializadas. Este complexo juncional recobre continuamente a superfície dos capilares cerebrais, sendo responsável por limitar o acesso celular e o tráfego de moléculas para o microambiente cerebral (Petty e Lo, 2002). A integridade funcional da BHE depende de fatores induzidos pelos astrócitos vizinhos, células endoteliais, pericitos e macrófagos perivasculares do espaço de Virchow-Robin e dos neurônios (Medana & Turner,

2006). Porém, durante condições inflamatórias, a permeabilidade da barreira pode ser alterada, permitindo a entrada de citocinas circulantes, leucócitos e outros mediadores e, portanto, o desenvolvimento de uma resposta imune no SNC (Adams *et al.*, 2002). Durante a MC, as modificações na barreira hematoencefálica, resultantes da ativação endotelial e do seqüestro de eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral, ocasionam alterações morfológicas no parênquima cerebral, com conseqüente ativação de micróglia, redistribuição de astrócitos e dano neuronal (Lou *et al.*, 2001). Em estudo prévio utilizando o modelo murino de MC por PbA, Medana *et al.*, (1997) demonstraram que astrócitos e micróglia, além dos monócitos, constituem uma importante fonte de produção de TNF- α . Dessa forma, as células da glia parecem desempenhar um importante papel na imunopatogênese da MC (Hunt e Grau, 2003; Combes *et al.*, 2005).

A ativação do sistema imune do hospedeiro em resposta a infecção pelo parasita acarreta a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias tipo Th1, especialmente o TNF- α e o IFN- γ (Hunt e Grau, 2003). O TNF- α tem sido descrito como a principal molécula envolvida nos eventos imunopatogênicos que caracterizam a MC (Hunt e Grau, 2003; Combes *et al.*, 2005). Na resposta imune inflamatória, uma função do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção e induzir a expressão de outros mediadores inflamatórios, em uma cascata de eventos (Brown *et al.*, 1999). Há evidências de que a produção excessiva desta citocina por monócitos/macrófagos desempenha um papel chave na patogênese da MC humana e experimental (Hunt e Grau, 2003; Combes *et al.*, 2005). Durante a MC, o TNF- α induz, em humanos e camundongos, a hiperexpressão de moléculas de adesão endotelial que têm sido implicadas no seqüestro de células na microvasculatura cerebral e em outros órgãos (Miller *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2006). Aumento significativo nas concentrações de TNF- α no soro e plasma de crianças com MC têm sido correlacionado com a gravidade da doença (Lyke *et al.*, 2004; John *et al.*, 2006). Em

adição a produção sistêmica, a liberação local de citocinas pode contribuir significativamente para a patogênese órgão-específica (Armah *et al.*, 2005). John *et al.* (2008) demonstraram que concentrações elevadas de TNF- α no líquido cefalorraquidiano de crianças com MC estão correlacionadas com a ocorrência de transtornos neurológicos e cognitivos durante a infecção e 6 meses após a resolução da mesma. Em adição, estudos *postmortem* e com modelos experimentais de MC têm confirmado a produção local de TNF- α no SNC durante a infecção (Medana *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999; Armah *et al.*, 2005; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010). Entretanto, há evidências recentes de que a produção excessiva de linfotóxina- α (TNF- β) seja mais importante na patogênese da MC do que o TNF- α , uma vez que camundongos geneticamente deficientes para TNF- α foram susceptíveis a MC enquanto que os *knockout* para linfotóxina- α não desenvolveram MC, apresentando apenas sinais típicos da malária como hiperparasitemia e anemia (Engwerda *et al.*, 2002).

Apesar de o TNF- α ser considerado o principal mediador inflamatório envolvido na patogênese da MC, outras citocinas, em especial o IFN- γ , têm sido descritas como importantes para o desenvolvimento da doença (Hunt e Grau, 2003). O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, de perfil Th1, que durante processos inflamatórios ou infecciosos, é produzida por células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, células NK (*Natural Killer*) e $\gamma\delta$ T (Nitcheu *et al.*, 2003). Estudos clínicos têm demonstrado aumento significativo nas concentrações de IFN- γ no soro de pacientes na fase aguda da infecção com o *Plasmodium falciparum* (Kossodo e Grau, 1993; Ho *et al.*, 1995). Além disso, tem sido descrito que camundongos *knockout* para IFN- γ e para o receptor de IFN- γ não desenvolvem MC, indicando um possível envolvimento desse mediador na patogênese da MC (Yanez *et al.*, 1996; Amani *et al.*, 2000). Na MC experimental, o IFN- γ atuaria induzindo a produção de TNF- α o que levaria a hiperexpressão de moléculas de adesão endotelial e o seqüestro de leucócitos na microvasculatura cerebral. Além disso, seria capaz de ativar a óxido nítrico sintase induzível

(iNOS) responsável pela produção de óxido nítrico (NO), importante na eliminação do parasita intracelular. (Amani *et al.*, 2000; Renia *et al.*, 2006). Entretanto, o mecanismo exato de ação do IFN- γ durante a MC permanece pouco elucidado (Belnoue *et al.*, 2008).

Em contrapartida, durante a infecção, citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e IL-4 (Th2), também são produzidas na tentativa de conferir proteção ao hospedeiro, uma vez que são capazes de regular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Kossodo *et al.*, 1997; Hunt e Grau, 2003). Entretanto, há evidências de que esse mecanismo protetor esteja deficiente na MC e que um desequilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias possa ser crucial para o desenvolvimento da doença (Kossodo *et al.*, 1997; De Souza e Riley, 2002).

As citocinas pró-inflamatórias, durante a MC humana e experimental, induzem a hiperexpressão de moléculas de adesão endotelial contribuindo para o aumento do seqüestro de eritrócitos infectados e do recrutamento de leucócitos ativados para a microvasculatura cerebral, em especial linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ T (Yanez *et al.*, 1996; Belnoue *et al.*, 2002; Nitcheu *et al.*, 2003). No modelo murino de MC utilizando a cepa PbA, o linfócito T CD8⁺ tem sido descrito como o principal subtipo celular seqüestrado na microvasculatura cerebral dos camundongos infectados. O seqüestro de linfócitos T CD8⁺ tem sido associado à ocorrência dos sinais neurológicos e ao óbito, indicando que essas células podem desempenhar um importante papel na patogênese da MC experimental (Renia *et al.*, 2006; Belnoue *et al.*, 2002). Há evidências de que os linfócitos T CD8⁺, na MC experimental, atuem por meio da via da perforina (Nitcheu *et al.*, 2003). Entretanto, o mecanismo de ação exato e a real contribuição dessas células para o desenvolvimento da MC, principalmente em humanos, permanecem pouco elucidados (De Souza e Riley, 2002; Nitcheu *et al.*, 2003).

1.10 – Processos Neuroquímicos e malária cerebral

A patogênese da MC é complexa e os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo desenvolvimento dessa condição permanecem pouco elucidados (Medana e Turner, 2006; Armah *et al.*, 2007). Estudos conduzidos em modelo murino de MC têm demonstrado a ocorrência de importantes distúrbios metabólicos no SNC, que incluem elevação das concentrações cerebrais de lactato e alanina, alterações na via da quinurenina (*kynurenine pathway*), além de aumento da atividade glutamatérgica (Sanni *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006). Essas alterações podem contribuir significativamente para as disfunções observadas no SNC durante a infecção (Hunt *et al.*, 2006).

O aumento significativo das concentrações cerebrais de lactato e alanina constituem um importante indicador de alterações no metabolismo da glicose e de presença de hipóxia. O seqüestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral com conseqüente obstrução do fluxo sanguíneo nos capilares cerebrais levando a hipóxia, seria o responsável pelo aumento da produção de lactato e alanina no SNC durante a MC (Sanni *et al.*, 2001). Há evidências de que em condições isquêmicas, o excesso de lactato possa causar, por meio de mecanismos citotóxicos, um edema cerebral e conseqüentes danos as células da glia e neurônios (Staub *et al.*, 1993). Dessa forma, alterações no metabolismo láctico parecem contribuir para o desenvolvimento da MC. Corroborando essa hipótese, estudos clínicos têm demonstrado que o aumento de lactato no líquido cefalorraquidiano de crianças com MC está correlacionado com a gravidade da doença (Dobbie *et al.*, 2000; Medana *et al.*, 2002).

A via de metabolismo do triptofano ou via da quinurenina parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento das alterações neurológicas observadas durante a MC humana e experimental (Sanni *et al.*, 2001; Medana *et al.*, 2003). Durante o metabolismo do triptofano, uma variedade de moléculas com potencial bioativo é gerada, em especial o ácido

quinoléico e o ácido quinurênico (Hunt e Grau, 2003). O ácido quinoléico possui atividade excitatória no SNC uma vez que é capaz de se ligar ao receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA). Em altas concentrações pode ter um efeito neurotóxico, causando danos ao SNC, que incluem disfunções mitocondriais e aumento da permeabilidade da BHE (Stone *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2003). Em contrapartida, o ácido quinurênico é considerado um antagonista natural do ácido quinoléico, com atividade neuroprotetora, uma vez que se liga aos receptores de glicina inibindo a ação excitatória do glutamato e de seus receptores, incluindo o NMDA (Stone *et al.*, 2003). Nesse sentido, um aumento significativo nas concentrações do ácido quinoléico no SNC e, portanto, um desequilíbrio na relação de produção ácido quinoléico/ácido quinurênico tem sido associado aos episódios de convulsão observados na MC humana e experimental (Sanni *et al.*, 1998; Dobbie *et al.*, 2000; Medana *et al.*, 2003). Uma possível explicação estaria relacionada ao fato de que os astrócitos seriam a principal fonte de produção de ácido quinurênico enquanto que o ácido quinoléico seria produzido por micróglia e por macrófagos recrutados na microvasculatura cerebral. A morfologia e função dos astrócitos estão significativamente alteradas durante a MC, o que justificaria o desequilíbrio na relação de produção ácido quinoléico/ácido quinurênico (Guillemin *et al.*, 2001).

O ácido quinoléico, quando produzido em excesso, tem sido implicado na patogênese da MC por seu efeito neurotóxico mediado por receptores glutamatérgicos, em especial o NMDA (Stone *et al.*, 2001; Stone *et al.*, 2003). Nesse sentido, um aumento na concentração de glutamato também foi observado em camundongos infectados com a cepa PbA (Rae *et al.*, 2004), indicando um possível envolvimento desse neurotransmissor no desenvolvimento da MC experimental. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente no SNC de mamíferos e em condições fisiológicas, desempenha um importante papel em processos relacionados à memória, aprendizado, desenvolvimento e plasticidade neural (Meldrum,

2000). Entretanto, em concentrações elevadas no SNC, esse neurotransmissor pode causar morte neuronal e neurodegeneração por meio de um processo conhecido como excitotoxicidade (Wang e Qin, 2010). Esse mecanismo excitotóxico tem sido implicado na gênese de uma variedade de doenças no SNC, incluindo condições isquêmicas, trauma e desordens neurodegenerativas (Lau e Tymianski, 2010). Baseado na concepção de que a MC constitui uma desordem isquêmica, o glutamato, assim como outros compostos metabólicos, incluindo o lactato e a alanina, tem sido implicado na patogênese dessa condição (Sanni *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que mediadores inflamatórios, em especial o TNF- α , podem modular a ação de neurotransmissores excitatórios, sugerindo que a interação entre esses sistemas (imune e neurotransmissor) pode ser responsável por diversas condições patológicas (Pickering e O'Connor, 2007; Viviani *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2008). O TNF- α produzido por células da glia, principalmente durante alterações no SNC como isquemia, infecções ou traumas, pode interferir na condução sináptica induzindo o aumento da expressão de receptores AMPA (receptor ácido: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) na superfície de neurônios além de induzir o aumento da liberação de glutamato por astrócitos (Bezzi *et al.*, 2001; Leonoudakis *et al.*, 2004; Stellwagen *et al.*, 2005). Nesse sentido, considerando que o TNF- α tem sido descrito como o principal mediador inflamatório envolvido na patogênese da MC, a produção excessiva dessa citocina pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento das concentrações de glutamato no SNC durante essa condição (Rae *et al.*, 2004). Entretanto, poucos estudos investigaram o envolvimento do glutamato na patogênese da MC (Sanni *et al.*, 1998; Rae *et al.*, 2004). Dessa forma, o mecanismo de ação e a real contribuição desse neurotransmissor para o desenvolvimento da doença permanecem pouco elucidados (Rae *et al.*, 2004).

Justificativa

2- JUSTIFICATIVA

A MC é a principal e mais grave complicação resultante da infecção por *P. falciparum* e constitui a principal causa de morbidade e mortalidade. Caracteriza-se por uma variedade de manifestações clínicas, que incluem alterações do nível de consciência, diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais. Além disso, apresenta uma fisiopatologia complexa e pouco elucidada, na qual alterações vasculares, imunológicas e metabólicas têm sido descritas. O modelo de MC utilizando a cepa PbA apresenta boa reprodutibilidade e mimetiza importantes alterações imunológicas, histopatológicas, metabólicas e clínicas encontradas na MC humana, sendo amplamente empregado no estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese dessa condição. Entretanto, poucos estudos utilizando modelos experimentais de MC têm investigado de forma sistemática, por meio de testes padronizados e validados, as diferentes alterações cognitivas e comportamentais que caracterizam essa condição e correlacionado com achados histopatológicos, imunológicos e neuroquímicos, o que justifica os objetivos propostos no presente trabalho.

Objetivos

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Investigar possíveis associações entre alterações cognitivas e comportamentais e processos inflamatórios e neuroquímicos no sistema nervoso central em modelo experimental de malária cerebral por *P. berghei* ANKA.

3.2 - Objetivos específicos

1 – Verificar as alterações comportamentais gerais pela bateria de testes SHIRPA em modelo experimental de MC por *P. berghei* ANKA.

2 – Investigar transtornos de ansiedade, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado, em modelo experimental de MC por *P. berghei* ANKA.

3 – Caracterizar os processos inflamatórios localizados no SNC por meio da análise da concentração de citocinas no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

4 – Investigar a concentração de glutamato no córtex cerebral e no líquido cefalorraquidiano de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Material e Métodos

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com idade de seis semanas, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o número de protocolo 105/2009.

4.2 - Parasito e infecção dos animais

Os camundongos foram infectados, com a cepa ANKA de *P. berghei*, intraperitonealmente (i.p.) com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas, em solução tampão fosfato estéril (PBS, 200ul), para garantir um grau de infecção uniforme nos diferentes grupos (Grau *et al.*, 1986). Os animais controle, sem infecção, receberam por via i.p., o mesmo volume de PBS.

4.3– Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais

Os parâmetros cognitivos e comportamentais foram avaliados por meio da bateria SHIRPA e do teste do Labirinto em Cruz Elevado. Antes dos testes, os animais foram conduzidos ao local do experimento para minimizar os efeitos da transferência sobre o resultado dos testes (Takahashi *et al.*, 2006). Os aparelhos foram devidamente limpos após a avaliação de cada animal, para evitar a influência de odores durante o teste (Zhu *et al.*, 2006).

4.3.1 – Bateria SHIRPA

A bateria de testes SHIRPA (sigla que significa **S**mithKline Beecham Pharmaceuticals; **H**arwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit **I**mperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; **R**oyal London School of Medicine; **P**henotype **A**ssessment) foi utilizada nesse estudo para avaliar alterações comportamentais e neurológicas durante o curso da infecção por PbA (Rogers *et al.*, 2001).

Constitui um paradigma dos estudos comportamentais em animais, com metodologia e materiais padronizados e vem sendo utilizada em estudos longitudinais (Rogers *et al.*, 1997). A bateria preliminar consiste em uma escala de observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas (Lalonde *et al.*, 2005). Esta série de 40 testes é baseada naquela desenvolvida por Irwin (1968), e fornece um perfil comportamental e funcional a partir da avaliação do desempenho individual de cada animal (Rogers *et al.*, 1997).

A bateria SHIRPA foi realizada com animais controle (n=8) e com camundongos infectados no 3º e 6º dia após a infecção (n=8). Inicialmente, o peso do animal é registrado. A seguir, ele é colocado em uma jarra de observação, localizada em cima de uma grade suspensa, e avaliado durante cinco minutos em relação à posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, tremor, defecação (número de bolos fecais), micção, número de “*headings*” (apoio apenas sobre as patas traseiras) e “*groomings*” (movimentos de “limpar” dirigidos a cabeça ou corpo, efetuados com as patas dianteiras). Transcorrido o tempo, uma chapa de metal é inserida sob a jarra de observação e o animal é transferido rapidamente para uma arena (“*open field*”) sem ser manuseado e é observado em relação à excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas, com as quatro patas, em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), fechamento das pálpebras, piloereção,

ambulação, elevação pélvica, elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal é então suspenso pela cauda e avaliado, sobre uma grade colocada em cima da arena, quanto à presença de encurvamento do tronco, capacidade de segurar as patas traseiras, posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, *pinna reflex*, reflexo corneal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra do arame. A seguir, o animal é contido pelo dorso em uma restrição supina e são avaliados o comprimento corporal, cor da pele, frequência cardíaca, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimejação, salivação, mordida provocada, reflexo postural, *geotaxis* negativo, medo, irritabilidade, agressão e vocalização. Comportamentos estereotipados, bizarros e convulsões são também registrados.

Os parâmetros observados foram classificados em cinco categorias funcionais (Quadro 1): estado neuropsiquiátrico, função reflexa e sensorial, tônus e força muscular, comportamento motor e função autônoma, para facilitar a análise dos dados, como realizado por Lackner *et al.*, (2006).

Quadro 1: Classificação das categorias funcionais da bateria SHIRPA de acordo com os parâmetros avaliados.

Domínios Funcionais	Parâmetros Avaliados
Função reflexa e sensorial	Posicionamento visual, <i>pinna reflex</i> , reflexo corneal, beliscada da pata traseira, reflexo postural
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida provocada, medo, irritabilidade, agressão e vocalização
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento do tronco, segurar as patas traseiras, manobra do arame, <i>geotaxis</i> negativa

Função autônoma	Taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, frequência cardíaca, lacrimejação, salivação, temperatura corporal
Tônus muscular e força	Força ao agarrar, tônus corporal, tônus dos membros e tônus abdominal

4.3.2 – Labirinto em Cruz Elevado

Constitui um dos principais testes para avaliação da ansiedade em camundongos, sendo um método válido de investigação comportamental (File, 2001; Carola *et al.*, 2002). Baseia-se no conflito entre o desejo de explorar novos ambientes e o medo de áreas abertas e desconhecidas, além da associação de elementos ansiogênicos tais como elevação e iluminação (Lau *et al.*, 2008).

O labirinto em Cruz Elevado (Insight[®], SP, Brasil) possui dois braços abertos e dois fechados, que emergem de uma plataforma central e estão dispostos em direções opostas formando uma cruz. A plataforma apresenta uma elevação da base (38,5 cm) e o aparato é iluminado por lâmpadas nos quatro braços e pela claridade do ambiente onde é aplicado o teste.

O teste foi realizado com animais infectados no 5º após a infecção (n=10) e com animais controle, sem infecção (n=10). Inicialmente, cada camundongo foi colocado na plataforma central do labirinto com a cabeça direcionada para o braço aberto. A seguir, o animal percorreu livremente o labirinto durante cinco minutos (Carola *et al.*, 2002; Walf e Frye, 2007). A frequência com que o camundongo entrou com as quatro patas nos braços

aberto e fechado e o tempo total em que permaneceu em ambos os braços foram registrados pelo avaliador.

A medida da ansiedade é a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (tempo ou entradas nos braços abertos/tempo ou entradas nos braços abertos e fechados X 100), sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade. O número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto tem sido descrito como uma medida da atividade locomotora (File, 2001; Walf e Frye, 2007).

4.4 – Histologia

Para avaliar as alterações estruturais e patológicas durante a infecção, estudos histopatológicos do tecido cerebral foram realizados. Os camundongos foram sacrificados por doses excessivas de anestésico (xilazina, Rompun[®], Bayer e quetamina, Laboratório Cristália, SP). Durante a necropsia, o tecido cerebral foi coletado e fixado por imersão em solução de formol tamponado a 10%. Após o período de fixação (12 horas), os tecidos foram recortados e seccionados transversalmente. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

Os tecidos foram, em seguida, submetidos à desidratação, com a finalidade de remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III), sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina, contendo o fragmento do órgão, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos cortes seriados com 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram avaliadas ao microscópico óptico, para estudos histológicos.

4.5 - Medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no cérebro por ELISA

4.5.1 - Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

Retirou-se um dos hemisférios dos cérebros de animais infectados e controles. Esses hemisférios foram, então, devidamente acondicionados e estocados a -20°C . Posteriormente, as amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1,0 mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89 g diluídos em 1 litro). As amostras foram maceradas por um homogenizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) a uma velocidade ótima e a solução resultante foi centrifugada a 10.000 r.p.m, a 4°C , por 10 minutos (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, EUA). O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a -20°C até a sua utilização para detecção da concentração das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ no tecido cerebral pelo método ELISA (Ensaio imunoenzimático: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

4.5.2 - Determinação de citocinas por ELISA

Os kits para ELISA de citocinas murinas (IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ) foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

As concentrações das citocinas foram avaliadas em diluição 1:3 em PBS contendo 1% de soro albumina bovina BSA. A uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ l de solução por orifício na concentração adequada do anticorpo de captura específico. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C e foi lavada 5 vezes com PBS/Tween 0,1% em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200 μ l de solução de bloqueio (PBS-1%BSA). O tempo de bloqueio foi de duas horas. Foram adicionados as amostras e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes para estabelecimento da curva padrão. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4°C. Foram adicionados então, 100 μ l de uma solução de anticorpo de detecção em cada poço da placa. A placa foi incubada por uma hora. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen). Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (492 nm) (Molecular Devices, USA).

4.6 – Medida da liberação cortical de glutamato dependente e independente de Ca²⁺

A liberação de glutamato dependente e independente de Ca²⁺ no córtex cerebral de camundongos infectados, no 3º e 6º dia após a infecção, e controles (sem infecção) foi

mensurada utilizando a técnica de preparação do sinaptosoma. Os camundongos foram mortos por meio de deslocamento cervical, pois a administração de anestésico interfere na obtenção do sinaptosoma. O cérebro foi retirado e o córtex separado e colocado em uma solução gradiente. Em seguida, as amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos e o homogenato centrifugado a 3000 r.p.m durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e colocado em gradiente de percoll (23%, 15%, 10%, 3%). As amostras foram novamente centrifugadas a 18000 r.p.m por 15 minutos. Após a centrifugação houve a formação de diferentes fases na amostra das quais as fases 3 e 4 contém o sinaptosoma. As fases 3 e 4 foram coletadas e foi realizada a lavagem do sinaptosoma com a solução tampão KRH (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, pH 7.4). Em seguida, a solução foi centrifugada novamente a 18000 r.p.m durante 15 minutos, obtendo-se assim o sinaptosoma purificado (pellet). A liberação cortical de glutamato na fenda sináptica foi então mensurada por um espectrofluorímetro RF5301PC (Shimadzu, Japan) por meio da reação: Glutamato + NAD + GDH = α - Cetoglutarato + NADPH (Prado *et al.*, 1996). Para avaliar a liberação cortical de glutamato independente de Ca²⁺, durante a leitura no espectrofluorímetro, foi adicionada a amostra o bloqueador de cálcio EGTA.

4.7 – Medida dos níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano

Os níveis de glutamato foram mensurados no líquido cefalorraquidiano de camundongos infectados, no 6º dia após a infecção, e controles (sem infecção). Os animais foram sacrificados com halotano, pois a administração de anestésico interfere na mensuração do glutamato, e colocados em um aparelho de estereotaxia, no qual o líquido cefalorraquidiano foi cuidadosamente extraído utilizando uma seringa para insulina, por meio da técnica de punção da cisterna magna (Sousa *et al.*, 2008). As amostras foram centrifugadas

a 10.000 r.p.m durante 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e imediatamente analisado por um espectrofluorímetro RF5301PC (Shimadzu, Japan).

4.8 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os dados foram apresentados com média \pm desvio-padrão (DP). Para análise dos domínios funcionais da bateria SHIRPA, da liberação cortical de glutamato e da concentração de citocinas no tecido cerebral foi utilizado o teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Os níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano e a atividade locomotora no teste do labirinto em cruz elevado foram analisados por meio do teste estatístico *t-student*. Para análise dos níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado foi utilizado o teste estatístico Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

5 – RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos científicos publicados em periódicos indexados. O artigo 1 refere-se aos objetivos específicos 1 e 4. O artigo 2 refere-se aos objetivos específicos 2 e 3.

5.1 – Artigo 1

Objetivos Específicos:

* Verificar as alterações comportamentais gerais pela bateria de testes SHIRPA em modelo experimental de MC por *P. berghei* ANKA.

* Investigar a concentração de glutamato no córtex cerebral e no líquido cefalorraquidiano de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Resultados:

Artigo publicado no Brazilian Journal of Medical and Biological Research em 2010.

Miranda AS, Vieira LB, Lacerda-Queiroz N, Souza AH, Rodrigues DH, Vilela MC, Gomez MV, Machado FS, Rachid MA, Teixeira AL. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. **Braz J Med Biol Res.** 2010; 43: 1173-1177.



BRAZILIAN JOURNAL
OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

www.bjournal.com.br

ISSN 0100-879X
Volume 43 (12) 1135-1244 December 2010

BIOMEDICAL SCIENCES
AND
CLINICAL INVESTIGATION

Braz J Med Biol Res, December 2010, Volume 43(12) 1173-1177

doi: 10.1590/S0100-879X2010007500130

Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria

A.S. Miranda, L.B. Vieira, N. Lacerda-Queiroz, A.H. Souza, D.H. Rodrigues, M.C. Vilela, M.V. Gomez, F.S. Machado, M.A. Rachid and A.L. Teixeira

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is partially financed by



Ministério
da Ciência e Tecnologia



Ministério
da Educação



Institutional Sponsors



GE Healthcare

Hotsite of proteomics metabolomics
developed by:



Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria

A.S. Miranda¹, L.B. Vieira³, N. Lacerda-Queiroz¹, A.H. Souza³, D.H. Rodrigues¹,
M.C. Vilela¹, M.V. Gomez³, F.S. Machado², M.A. Rachid¹ and A.L. Teixeira¹

¹Laboratório de Imunofarmacologia, ²Laboratório de Imunoregulação de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
³Laboratório de Medicina Molecular (INCT), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

Abstract

Cerebral malaria (CM) is a severe complication resulting from *Plasmodium falciparum* infection. This condition has been associated with cognitive, behavioral and motor dysfunctions, seizures and coma. The underlying mechanisms of CM are incompletely understood. Glutamate and other metabolites such as lactate have been implicated in its pathogenesis. In the present study, we investigated the involvement of glutamate in the behavioral symptoms of CM. Seventeen female C57BL/6 mice (20-25 g) aged 6-8 weeks were infected with *P. berghei* ANKA by the intraperitoneal route using a standardized inoculation of 10⁶ parasitized red blood cells suspended in 0.2 mL PBS. Control animals (N = 17) received the same volume of PBS. Behavioral and neurological symptoms were analyzed by the SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment (SHIRPA) battery. Glutamate release was measured in the cerebral cortex and cerebrospinal fluid of infected and control mice by fluorimetric assay. All functional categories of the SHIRPA battery were significantly altered in the infected mice at 6 days post-infection (dpi) ($P \leq 0.05$). In parallel to CM symptoms, we found a significant increase in glutamate levels in the cerebral cortex (mean \pm SEM; control: 11.62 ± 0.90 nmol/mg protein; infected at 3 dpi: 10.36 ± 1.17 nmol/mg protein; infected at 6 dpi: 26.65 ± 0.73 nmol/mg protein; with EGTA, control: 5.60 ± 1.92 nmol/mg protein; infected at 3 dpi: 6.24 ± 1.87 nmol/mg protein; infected at 6 dpi: 14.14 ± 0.84 nmol/mg protein) and in the cerebrospinal fluid (control: 128 ± 51.23 pmol/mg protein; infected: 301.4 ± 22.52 pmol/mg protein) of infected mice ($P \leq 0.05$). These findings suggest a role of glutamate in the central nervous system dysfunction found in CM.

Key words: Cerebral malaria; Glutamate; Cerebrospinal fluid; Behavioral changes; SHIRPA

Introduction

Cerebral malaria (CM) is a severe complication resulting from *Plasmodium falciparum* infection (1). This condition is associated with at least 2.3 million deaths per year out of an estimated 400 million cases of malaria occurring each year worldwide (2).

According to WHO criteria, CM is a clinical syndrome defined as a potentially reversible diffuse encephalopathy characterized mainly by coma and the presence of asexual forms of *P. falciparum* parasites in peripheral blood smears in the absence of other causes of encephalopathy (3). This condition can cause a wide range of clinical manifestations

including cognitive, behavioral and motor dysfunctions, seizures and coma (1).

The underlying mechanisms of CM have been extensively investigated. However, the pathogenesis of CM is incompletely understood (4). One of the major hypotheses is the sequestration of parasitized red blood cells in the cerebral microvascular endothelium leading to blood flow obstruction and decreased tissue perfusion, thereby compromising the function of the central nervous system (CNS) (1).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in

Correspondence: A.S. Miranda and A.L. Teixeira, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil. Fax: +55-31-3409-2651.
E-mail: alines.miranda@hotmail.com and altextr@gmail.com

Received June 2, 2010. Accepted October 27, 2010. Available online November 19, 2010. Published December 20, 2010.

the mammalian CNS, playing an important role in neuronal development, synaptic plasticity, learning and memory processes under physiological conditions (5). However, high amounts of glutamate release in intersynaptic spaces can cause neuronal cell death and neurodegeneration via excitotoxicity processes (6). Excitotoxicity plays an important role in many CNS diseases, including ischemia, trauma, and neurodegenerative disorders (7). Based on the concept that CM can be regarded as an ischemic disorder, some studies have implicated glutamate and other metabolites such as lactate, alanine and glycine in its pathogenesis (8-10). However, these studies did not evaluate the role of glutamate release and its association with CNS dysfunction in CM.

In the present study, we determined the involvement of glutamate in the behavioral symptoms occurring in CM. We analyzed behavioral and neurological symptoms, Ca^{2+} -independent and -dependent glutamate release in the cerebral cortex and glutamate levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA (PbA).

Material and Methods

Animals

Thirty-four female C57BL/6 mice (20-25 g) aged 6-8 weeks were obtained from the Animal Care Facilities of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. The animals were housed in cages in temperature-controlled rooms and received food and water *ad libitum*. All procedures described had prior approval from the Animal Ethics Committee (CETEA) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) under license number 105/09.

Parasites and experimental infection

An uncloned parasite line of *P. berghei* (strain ANKA) (PbA) was used. *P. berghei* ANKA-parasitized red blood cells (pRBC) from C57BL/6 mouse donor strains were maintained in stabilized liquid nitrogen, thawed and passed into normal C57BL/6 mice that later served as parasite donors. C57BL/6 mice were infected by intraperitoneal (*ip*) injection of 10^6 pRBC suspended in 0.2 mL PBS (11). Control animals received the same volume of PBS. The level of parasitemia of infected mice was monitored on Giemsa-stained blood films from day 3 onwards and estimated by counting at least 1000 RBCs under oil immersion.

SHIRPA screen

Behavioral and functional parameters were evaluated using a screening battery called SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment (SHIRPA) until the 6th day post-infection (dpi). The procedure was carried out at 0 (day of infection) and then from day 3 until death on a daily basis. The SHIRPA screen was conceived as a multi-test behavioral battery used for longitudinal studies

with standardized guidelines and materials (12). This battery encompasses 40 tests, which provide a behavioral and functional profile. For analysis purposes, these individual parameters assessed by SHIRPA were organized into five functional categories: neuropsychiatric state (spontaneous activity, transfer arousal, touch escape, positional passivity, biting, fear, irritability, aggression, vocals); motor behavior (body position, tremor, locomotor activity, pelvic elevation, gait, tail elevation, trunk curl, limb grasping, wire maneuver, negative geotaxis); reflex and sensory function (startle response, visual placing, pinna reflex, corneal reflex, toe pinch, righting reflex); autonomous function (respiration rate, defecation, urination, palpebral closure, piloerection, skin color, heart rate, lacrimation, salivation, body temperature); muscle tone and strength (grip strength, body tone, limb tone, abdominal tone) and an overall score was obtained as described by Lackner et al. (13). Animals were allowed to habituate to their new environment for 2 days before behavioral assessment. A total of 8 animals per group were used in this procedure.

Glutamate release and measurement in the cerebral cortex

Synaptosomes were prepared as previously described (14). Mice were decapitated and their cortices were removed and homogenized in 1:10 (w/v) 0.32 M sucrose containing 0.25 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA. Homogenates were then submitted to low-speed centrifugation (1000 g/10 min) and isolated nerve terminals (synaptosomes) were purified from the supernatant by discontinuous Percoll-density gradient centrifugation (15). The synaptosomes were resuspended in 400 μ L Krebs-Ringer-HEPES buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 10 mM glucose, 25 mM HEPES, pH 7.4), divided into 200- μ L aliquots and stored on ice for later measurement of glutamate release. The glutamate release assay was performed using an RF5301PC spectrofluorimeter (Shimadzu, Japan) monitoring the increase in fluorescence due to the production of NADPH⁺ in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP⁺ (16). Glutamate release was measured in the cerebral cortex of PbA-infected mice at 3 and 6 dpi and of control mice. A total of 9 animals per group were used.

Measurements of glutamate levels in the cerebrospinal fluid

Glutamate levels were measured in the CSF of PbA-infected mice at 6 dpi and of control mice. Briefly, the mice were killed with halothane and placed in a stereotaxic apparatus, where the CSF was carefully removed (10 μ L per mouse) with an insulin syringe (27 gauge x 1/2 in length), using the cisterna magna puncture technique. All samples were centrifuged at 10,000 g in an Eppendorf centrifuge for 5 min to obtain cell-free supernatants and were immediately analyzed with a spectrofluorimeter. Glutamate measurement was performed enzymatically according

to the increase in fluorescence due to the production of NADPH⁺ in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP⁺ (16). To start the assay, 1.0 mM NADP⁺ and 50 U glutamate dehydrogenase were added to the CSF samples 10 min after the measurement of emitted fluorescence (14). The excitation wavelength was 360 nm and the emission wavelength was 450 nm using a PTI spectrofluorimeter. Nine animals per group were used to quantify the levels of glutamate in the CSF. At least three independent experiments were performed and three samples of the CSF were analyzed in each group. The samples were obtained from the same animals used for glutamate measurements in the cerebral cortex.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey multiple comparison post-test was used to analyze the behavioral and functional categories of SHIRPA and the brain cortical glutamate release. The unpaired Student *t*-test was used to analyze glutamate levels in the CSF. All analyses were performed using the Prism 4 software (GraphPad, USA).

Results

The SHIRPA battery was used to evaluate the behavioral changes of infected mice at 3 and 6 dpi. No difference was found between infected mice and controls at 3 dpi. However, all functional categories of the SHIRPA battery were significantly altered in infected mice at 6 dpi compared to the control group. When the infected mice were compared at 6 dpi to the infected mice at 3 dpi, a progressive impairment of autonomous function, neuropsychiatric state, motor behavior and muscle tone and strength was observed (Figure 1).

Since abnormal glutamatergic neurotransmission has been implicated in a wide range of neurological diseases, we measured glutamate release from isolated brain cortical nerve terminals (synaptosomes) in this CM model. No difference was found between infected mice at 3 dpi and controls. We observed that glutamate release was significantly increased in the infected mice at 6 dpi in comparison with both

infected mice at 3 dpi and control animals (Figure 2). Synaptosomes from control animals were exposed to 33 mM KCl to depolarize their membranes and induce glutamate release (Figure 2). KCl-evoked glutamate release from synaptosomes obtained from infected mice at 6 dpi was approximately 3-fold higher than that observed in control animals (Figure 2; $P \leq 0.05$).

When synaptosomes were depolarized with KCl, the release of glutamate was the sum of two components: one that is extracellular calcium dependent and inhibited by the calcium chelator EGTA, and the other, which is extracellular calcium independent and not sensitive to EGTA. We therefore measured KCl-evoked glutamate release in infected mice at 3 and 6 dpi and in control synaptosomes in the presence of EGTA, which reflects the calcium-independent pool. In both situations (control and infected mice), KCl-evoked glutamate release was reduced in the presence of EGTA (Figure 2; $P \leq 0.05$). Even in the presence of EGTA,

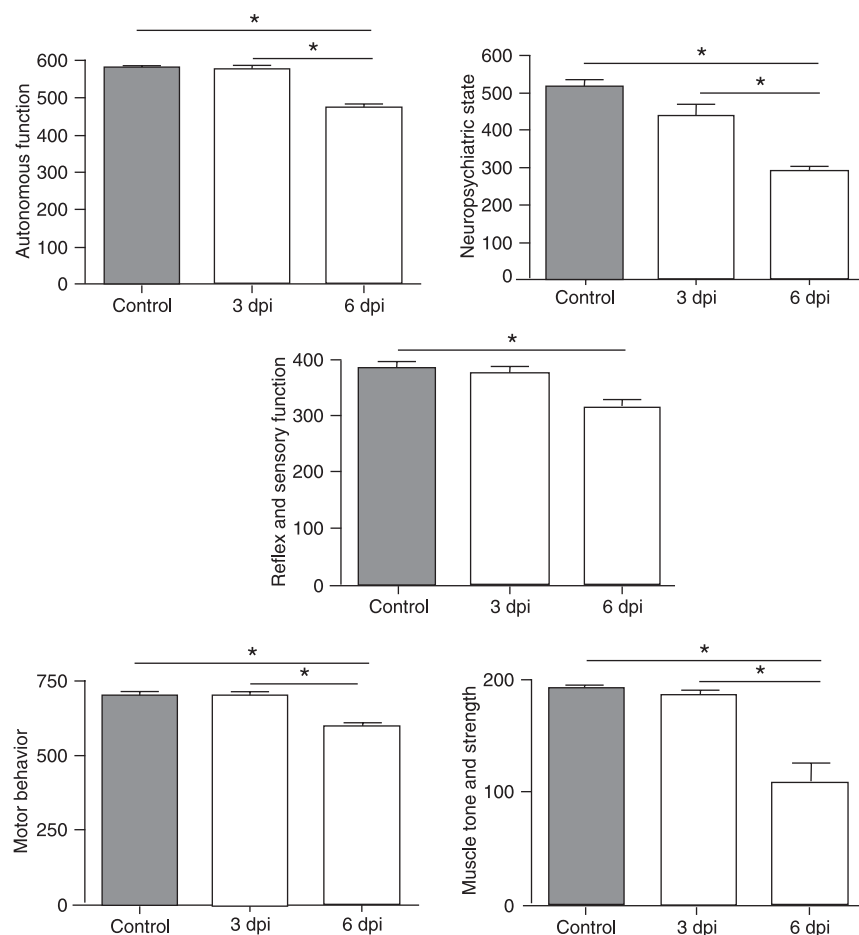


Figure 1. Performance of *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)-infected mice at 3 and 6 days post-infection (dpi) and of the control group in the five functional categories of the SHIRPA battery. An overall score was used for each functional domain. Data are reported as means \pm SEM. * $P \leq 0.05$ (ANOVA followed by the Tukey multiple comparison post-test).

glutamate release was significantly increased in infected mice at 6 dpi compared to both infected mice at 3 dpi and controls.

We also measured CSF glutamate levels in PbA-infected mice at 6 dpi. The 6th dpi was chosen because it was the day we found the highest levels of brain glutamate associated with behavioral changes in infected mice. The glutamate levels found in the CSF of infected mice were significantly increased compared to control animals (mean \pm SEM; control: 128 ± 51.23 pmol/mg protein; infected: 301.4 ± 22.52 pmol/mg protein; $P \leq 0.05$. Results are representative of three independent experiments).

Discussion

We investigated behavioral symptoms in C57BL/6 mice infected with PbA using the SHIRPA screen battery. In our study, we observed progressive neurological and behavioral changes. At 6 dpi most of the SHIRPA domains were significantly altered including, neuropsychiatric state, motor behavior, reflex and sensory function, autonomous function, muscle tone and strength. In order to detect a neurochemical marker of CM, we investigated the involvement of glutamate in the development of CM. The amount of glutamate present in the cerebrocortical synaptosomes as well as in the CSF of infected mice was significantly increased at 6 dpi. Since there is a parallel increase in brain and CSF glutamate levels with the neurological symptoms of CM, this may suggest a role for glutamate in CM pathogenesis.

Animals susceptible to PbA infection such as C57BL/6 mice develop neurological and behavioral symptoms that are similar to those observed in human CM, which include ataxia, paralysis, seizures, and coma (17). In the present study, using the SHIRPA battery, we found a wide range of behavioral changes in infected mice at 6 dpi. In agreement with these findings, previous studies also described significant changes in the functional categories of the SHIRPA battery approximately 6 days after PbA infection (13,18).

The excitotoxicity process mediated by glutamate and other amino acids, such as aspartic acid and quinolinic acid that act via glutamate receptors, has been implicated in the occurrence of neurological and cognitive symptoms in CM (8-10,19,20). In the present study, we found increased glutamate release in the brain and increased levels of this neurotransmitter in the CSF of PbA-infected mice in association with behavioral changes. To the best of our knowledge, no previous study has investigated the association between increased glutamate release into intersynaptic spaces and CNS dysfunction in CM. A study performed by Rae et al.

References

1. Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* 2005; 4: 827-840.

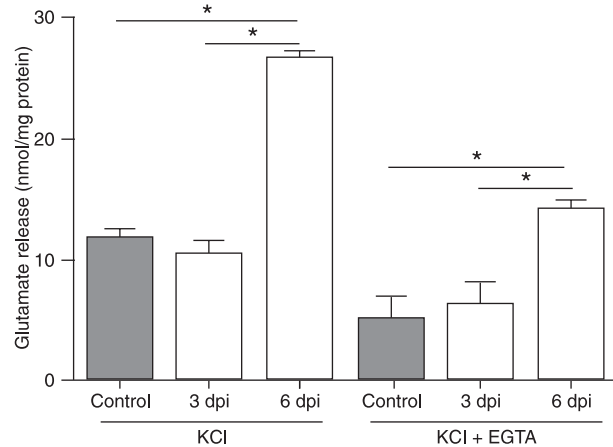


Figure 2. Cerebral malaria induces glutamate release from brain synaptosomes. *KCl*: 33 mM KCl-evoked glutamate release from C57BL/6 control mice and from C57BL/6 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)-infected mice at 3 and 6 days post-infection (dpi). *KCl + EGTA*: Calcium-independent glutamate release evoked by 33 mM KCl from C57BL/6 control mice synaptosomes and from C57BL/6 PbA-infected mice at 3 and 6 dpi. Data are reported as means \pm SEM of at least three independent experiments for each experimental condition. * $P \leq 0.05$ (ANOVA followed by the Tukey multiple comparison post-test).

(9) demonstrated an increase of glutamate C4(γ) levels as measured by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the metabolite pool from brain extracts of PbA-infected mice at 6 dpi. We confirmed the increase of glutamate levels and demonstrated an enhanced release of glutamate in the synaptic cleft. Furthermore, studies of biochemical changes have demonstrated increased levels of quinolinic acid in the CSF of adults and children with CM, indicating a role of excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of the disease (19,20). Parekh et al. (10) also found an increase of glutamine levels in the metabolite pool from brain extracts of PbA-infected mice. Taken together, these studies suggest that an imbalance in glutamate/glutamine metabolism may be relevant to CM pathogenesis.

In conclusion, we found that increased glutamate release is associated with neurological and behavioral symptoms in CM. These findings suggest a role for glutamate in the CNS dysfunction found in CM disease.

Acknowledgments

Research supported by CAPES, CNPq, and Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBNet/FINEP), Brasil.

2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434: 214-217.

3. World Health Organization (WHO). Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 1-90.
4. Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006; 36: 569-582.
5. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000; 130: 1007S-1015S.
6. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 2010; DOI 10.1007/s10495-010-0481-0.
7. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 2010; 460: 525-542.
8. Sanni LA, Rae C, Maitland A, Stocker R, Hunt NH. Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *Am J Pathol* 2001; 159: 1105-1112.
9. Rae C, McQuillan JA, Parekh SB, Bubb WA, Weiser S, Balcar VJ, et al. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *FASEB J* 2004; 18: 499-510.
10. Parekh SB, Bubb WA, Hunt NH, Rae C. Brain metabolic markers reflect susceptibility status in cytokine gene knockout mice with murine cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006; 36: 1409-1418.
11. Grau GE, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassalli P, Lambert PH. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol* 1986; 137: 2348-2354.
12. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 1997; 8: 711-713.
13. Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32: 177-188.
14. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 1993; 296 (Part 2): 313-319.
15. Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, Rostas JA. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 1988; 441: 59-71.
16. Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 1987; 49: 50-57.
17. de Souza JB, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 2002; 4: 291-300.
18. Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos ER, et al. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol* 2010; 125: 271-278.
19. Dobbie M, Crawley J, Waruiru C, Marsh K, Surtees R. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 284-290.
20. Medana IM, Hien TT, Day NP, Phu NH, Mai NT, Chu'ong LV, et al. The clinical significance of cerebrospinal fluid levels of kynurenine pathway metabolites and lactate in severe malaria. *J Infect Dis* 2002; 185: 650-656.

5.2 – Artigo 2

Objetivos Específicos:

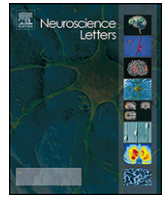
* Investigar transtornos de ansiedade, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado, em modelo experimental de MC por *P. berghei* ANKA.

* Caracterizar os processos inflamatórios localizados no SNC por meio da análise da concentração de citocinas no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Resultados:

Artigo publicado na Neuroscience Letters em 2011.

Miranda AS, Lacerda-Queiroz N, Vilela MC, Rodrigues DH, Rachid MA, Quevedo J, Teixeira AL. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). **Neurosci Lett.** 2011; 491: 202-206. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.01.038.



Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA)

Aline Silva de Miranda^{a,b,*}, Norinne Lacerda-Queiroz^b, Márcia de Carvalho Vilela^b, David Henrique Rodrigues^b, Milene Alvarenga Rachid^b, João Quevedo^c, Antônio Lúcio Teixeira^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Laboratory of Neurosciences and National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2010

Received in revised form

30 November 2010

Accepted 14 January 2011

Keywords:

Cerebral malaria

Anxiety-like behavior

Elevated plus maze

Inflammatory cytokines

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is a severe complication resulting from *Plasmodium falciparum* infection. The underlying mechanisms of CM pathogenesis remain incompletely understood. The imbalance between the release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines has been associated with central nervous system dysfunction found in human and experimental CM. The current study investigated anxiety-like behavior, histopathological changes and release of brain cytokines in C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA (PbA). Anxiety-like behavior was assessed in control and PbA-infected mice using the elevated plus maze test. Histopathological changes in brain tissue were assessed by haematoxylin and eosin staining. Brain concentration of the cytokines IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α and IFN- γ was determined by ELISA. We found that PbA-infected mice on day 5 post-infection presented anxiety symptoms, histopathological alterations in the brainstem, cerebrum and hippocampus and increased cerebral levels of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . These findings suggest an involvement of central nervous system inflammatory mediators in anxiety symptoms found in CM.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Malaria is associated with at least 2.3 million deaths annually, from an estimated 400 million cases of malaria each year worldwide [28]. Cerebral malaria (CM) is a severe complication resulting from *Plasmodium falciparum* infection [13].

The underlying mechanisms of CM pathogenesis remain incompletely understood [11,24]. High levels of circulating and cerebral tissue proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β have been associated with central nervous system (CNS) dysfunction found in human and experimental CM [2,3,14,25].

Overproduction of proinflammatory cytokines, especially TNF- α , induces an increase of adhesion molecule expression on vascular endothelium with subsequent sequestration of leucocytes, parasitized red blood cells (pRBC) and platelets, leading to microvascular obstruction and hypoxia [6]. In addition, the release of anti-inflammatory cytokines, mainly IL-10, seems to have a host-protective role by regulating the synthesis of proinflammatory

cytokines in response to the parasite. However, this host-protective mechanism might be deficient in CM disease [12,18]. In this context, an imbalance in the release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines seems to be crucial to the development of CM [6,18].

Animal models have been of great relevance in the study of the mechanisms involved in CM pathogenesis [6,27]. Due to the high degree of reproducibility, easily manageable characteristics and development of histopathological and neurological signs typical of human CM, the murine model using the *Plasmodium berghei* strain ANKA (PbA) has been widely used to better understand this condition [24].

Behavioral and neurological symptoms in PbA-infected mice have been associated with neuroinflammatory processes [7,19,20]. However, to the best of our knowledge, no previous study has investigated the occurrence of anxiety-like behavior associated with CNS inflammation in CM. Thus, the aim of the current study was to investigate anxiety-like behavior and the release of brain cytokines in C57BL/6 mice infected with PbA.

All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Female C57BL/6 mice (20–25 g), aged 6–8 weeks, were obtained from Animal Care Facilities of the Institute of Biological Sciences, UFMG. Animals were

* Corresponding authors at: Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brazil. Tel.: +55 31 34092651; fax: +55 31 34092651.

E-mail addresses: alines.miranda@hotmail.com (A.S. de Miranda), altextr@gmail.com (A.L. Teixeira).

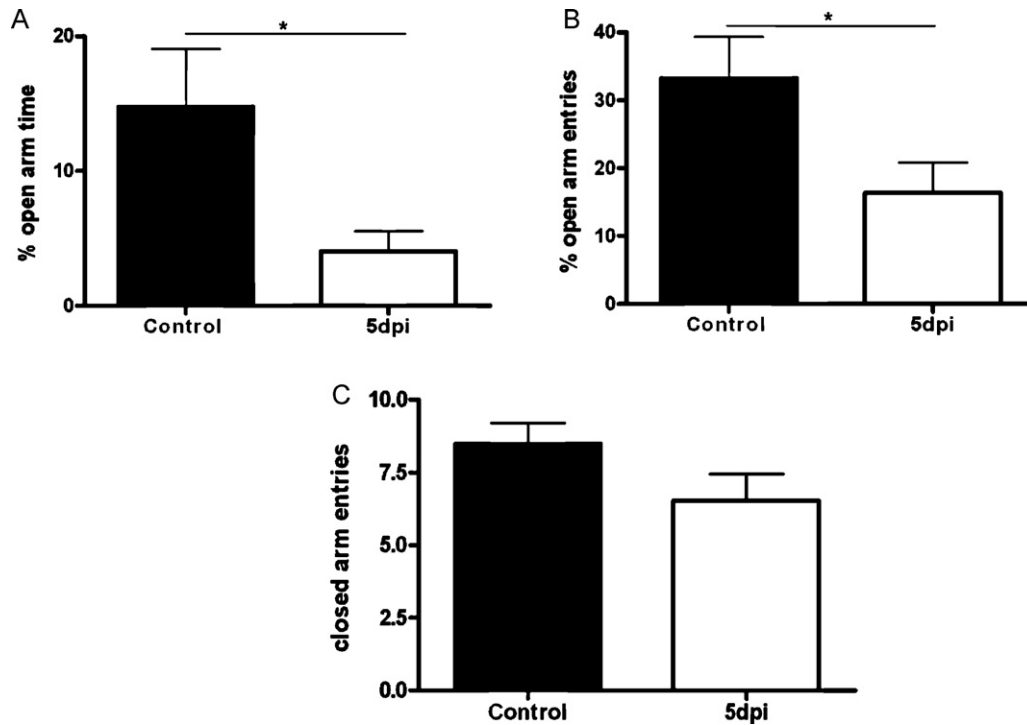


Fig. 1. Anxiety and locomotor measures of PbA-infected mice on day 5 post-infection (dpi) and of control group in the elevated plus maze. (A) % open arm time; (B) % open arm entries and (C) closed arm entries. Results were expressed as the mean \pm SEM from at least ten animals per group. Asterisk(s) indicate statistical differences where $^*p < 0.05$.

housed in cages in temperature-controlled rooms and received food and water *ad libitum*.

Uncloned parasite line of *P. berghei* (strain ANKA) (PbA) was used in this study. *P. berghei* ANKA pRBC from C57BL/6 mice donor strains were maintained in stabilized liquid nitrogen and were thawed and passed into normal C57BL/6 mice that served afterwards as parasite donors. C57BL/6 mice were infected by intraperitoneal (i.p.) injection of 10^6 pRBC suspended in 0.2 mL PBS [10]. Control animals received the same volume of PBS. The level of parasitemia in infected mice was monitored on Giemsa-stained blood films from day 3 onwards and estimated at 1000 RBCs under immersion oil.

Anxiety-like behavior was assessed in control and infected mice on day 5 post-infection (p.i.) using the elevated plus maze (Insight[®], SP, Brazil). Anxiety-like behavior was evaluated on day 5 p.i. in agreement with previous studies describing the onset of behavioral symptoms in CM mice on day 5 after infection with PbA [19,20]. The elevated plus maze (EPM) is a test of unconditioned anxiety-related behavior that involves a conflict between the rodent's desire to explore a novel environment and anxiogenic elements such as elevation and an unfamiliar open area [23]. This is a widely used test for anxiety behavior of rodents [9,23,26]. The EPM test was conducted as previous described by Walf and Frye [30]. Briefly, mice were placed in the center of the maze facing an open arm and were allowed to freely explore the EPM for 5 min. The animal placing all four paws onto the arm was considered to be in the arm, otherwise the animal was in the center of the maze. Behavior that was recorded when rodents were in the EPM included the time spent and entries made on the open and closed arms. The measures of anxiety were the percentage (%) of open arm entries and the percentage (%) of time spent on the open arms. The number of closed arm entries was considered as a locomotor measure. Decreased open arm activities indicate increased anxiety levels in EPM. Between each trial, the maze was wiped clean with a damp sponge and dried with paper towels. Before behavioral assessment,

animals were allowed to accommodate to their new environment for 2 days.

For histological and inflammatory analyses the brain tissues of controls and PbA-infected mice on day 3 and 5 p.i. were removed. One hemisphere of the brain was homogenized in extraction solution containing aprotinin and the concentration of the cytokines IL-1 β , IL-4, IL-10, TNF- α and IFN- γ was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN and Pharmingen, San Diego, CA). Another hemisphere of the brain was preserved in 10% buffered formalin. Sections of 5 μ m thick were cut and mounted for routine haematoxylin and eosin (H&E) staining. These sections were examined at the optical level (Olympus, Japan, JP). Digital images were acquired for documentation.

Data are shown as mean \pm SEM. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison post-test was used to analyze the brain concentrations of cytokines measured by ELISA. To analyze the anxiety behavior and locomotor activity in the EPM the Mann Whitney's test and the *t*-student's test were used, respectively. All analyses were performed using Prism 4 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

CM mice presented a significant decrease in the percentage (%) of time spent on the open arms and in the number of entries into the open arms when compared to the control animals on day 5 p.i. (Fig. 1A and B; $p \leq 0.05$; $n = 10$ per group). No difference was found in the number of entries in the closed arms between the infected mice and controls, indicating that both groups presented similar locomotor activity in the EPM (Fig. 1C; $p = 0.12$).

No lesions were detected in the brain of non-infected group and PbA-infected group on day 3 (Fig. 2A, D and G). Infected mice on day 5 p.i. developed focal meningitis, consisted mainly of lymphocytes and macrophages (Fig. 2B). Sequestration of leukocytes in the microvasculature (vascular plugging) was detected in the cerebrum, brainstem and hippocampus (Fig. 2C and F). The hippocampus of PbA-infected animals on day 5 p.i. presented various shrinkage pyramidal neurons in the medial area of CA1 (Fig. 2H).

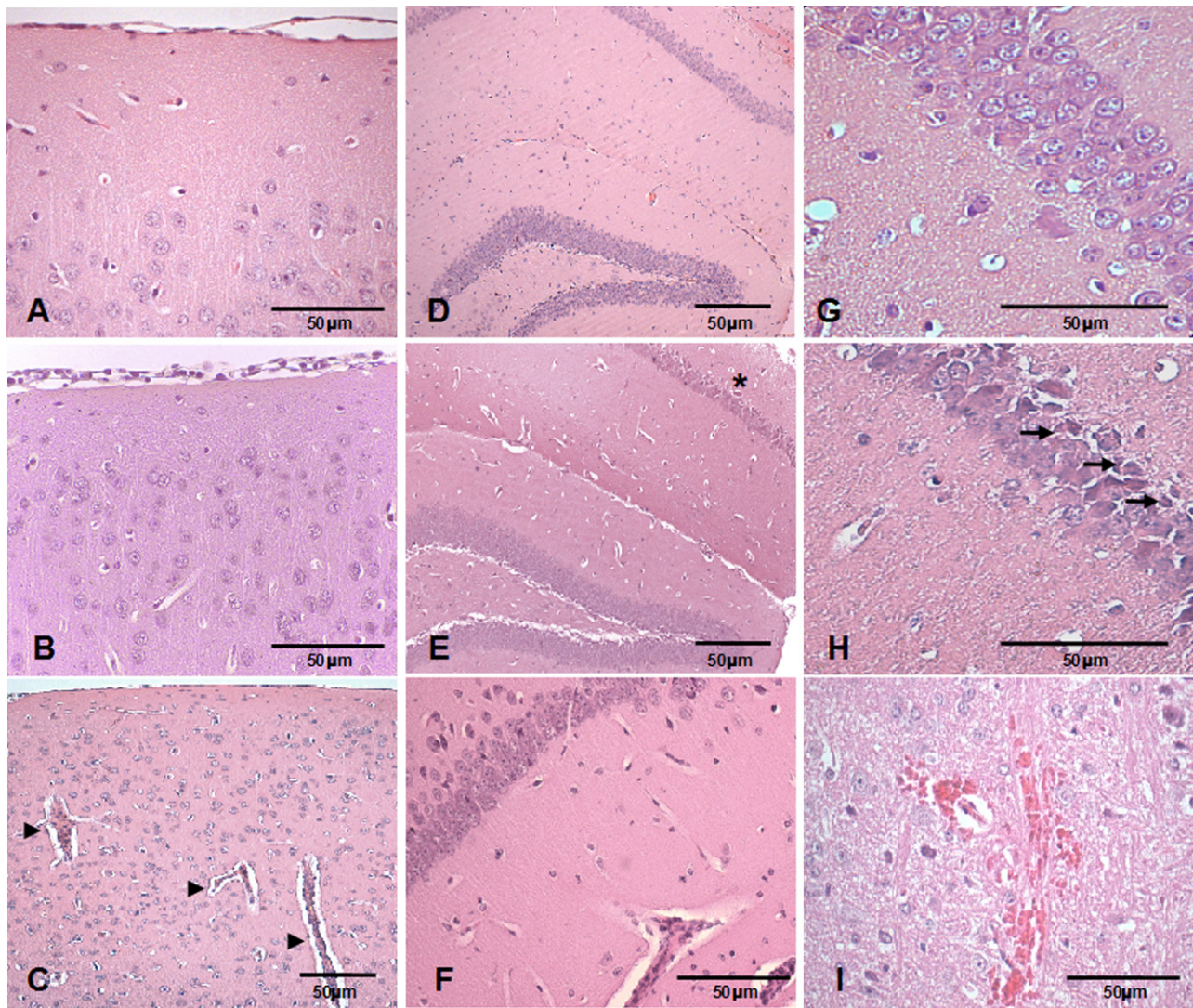


Fig. 2. Representative H&E-stained sections from brains of control (A, D and G) and PbA-infected mice on day 5 p.i. (B–C, E–F, H–I). (A) Normal histological cerebrum. (B) Cells infiltrating the meninges in the cerebrum from PbA-infected. (C) Vascular plugging (arrow heads) in the cerebral cortex. (D) and (G) Hippocampus with preserved CA1 area and dentate gyrus. (E) and (H) Note altered CA1 region (asterisk) characterized by shrinkage pyramidal neurons (arrows). (I) Focal microhemorrhage in the brainstem.

The brainstem exhibited multifocal hemorrhages around blood vessels (Fig. 2I).

PbA-infected mice presented higher cerebral levels of IL-1 β and TNF- α on day 5 p.i. when compared with controls and infected mice on day 3 p.i. (Fig. 3; $p \leq 0.05$). No significant difference was found in brain levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ between PbA-infected mice and controls (Fig. 3).

To the best of our knowledge, this is the first study which investigated anxiety-like behavior in CM. We showed that PbA-infected mice on day 5 p.i. presented anxiety symptoms associated with increased cerebral levels of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , and histopathological changes in the brainstem, cerebrum and hippocampus.

Behavioral and cognitive symptoms associated with neuroinflammatory processes in CM have been described in experimental and clinical studies [7,16,19,27]. Our group has previously demonstrated that leukocyte recruitment induced by increased levels of cytokines and chemokines in the brain were associated with behavioral and neurological alterations in PbA-infected mice [19]. Additionally, Desruisseaux et al. [7] showed that memory dysfunction in experimental malaria correlated with brain inflammation and hemorrhage, and also microglial activation. In PbA infection,

TNF- α is produced by microglia, astrocytes, monocytes and cerebral vascular endothelium whereas IL-1 β is produced by monocytes, meningeal vascular endothelium and cortical neurons [25]. In a clinical study with CM children and health controls, John et al. [16] demonstrated that high levels of TNF- α in the cerebrospinal fluid of CM children correlated with neurological and cognitive deficits at hospital discharge, 3 and 6 months later. An upregulation of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α has been also described in the serum of CM children [15,22]. Altogether these studies suggest that the release of proinflammatory mediators in the CNS may be involved in a wide range of behavioral symptoms described in murine and human CM.

Some evidence suggests that an overproduction of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α could be involved in the development of anxiety [1,4,5,17]. Previous works have demonstrated that systemic (intraperitoneal route) and central (intracerebroventricular route) administration of IL-1 β and TNF- α in rodents caused a decrease in the percentage of entries and of time spent on the open arms of the EPM, without a significant change of closed-arm entries [1,4,5]. Koo and Duman [17] measured anxiety behavior using the EPM in rats after infusion of IL-1 β in the lateral ventricle and in mice with a null muta-

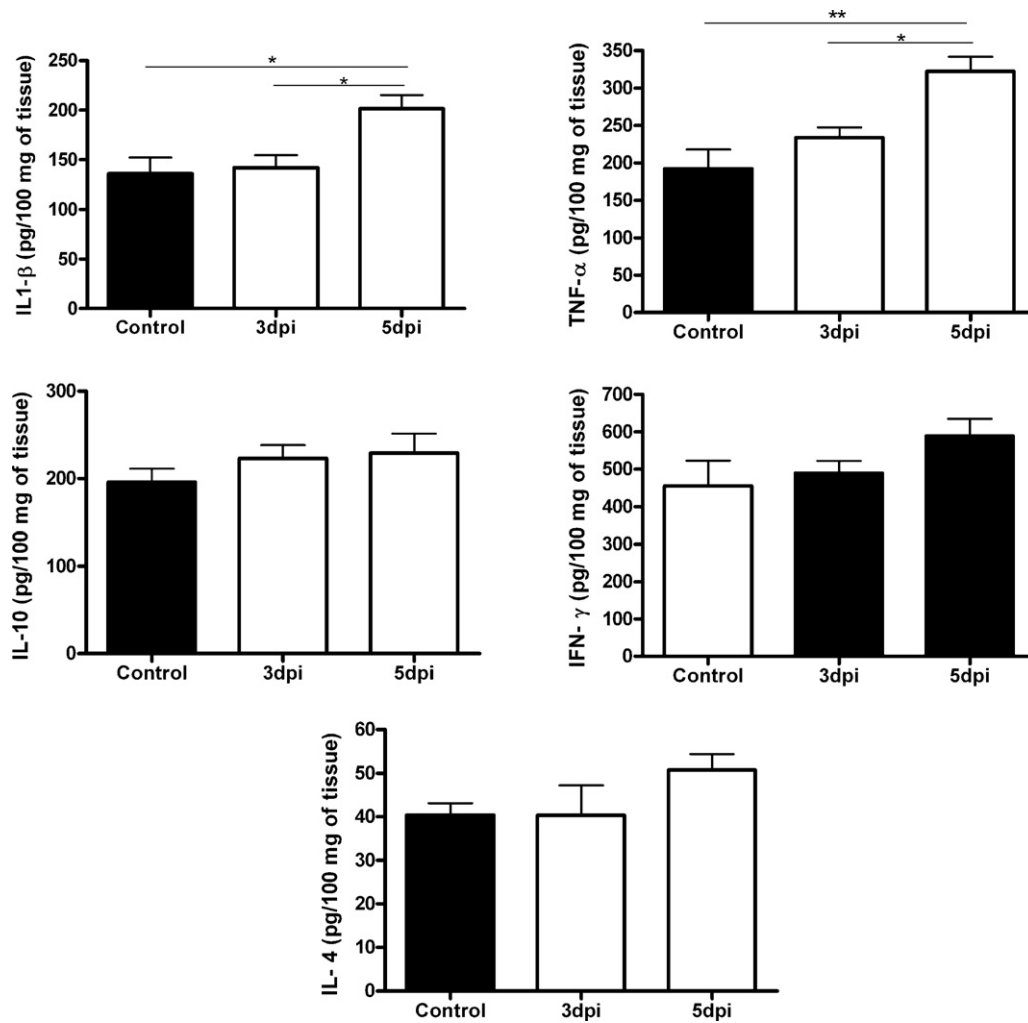


Fig. 3. Comparative analysis of proinflammatory (IL-1 β and TNF- α), anti-inflammatory (IL-10), Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4) cytokines concentration in the brain of PbA-infected mice on day 3 and 5 post-infection (dpi) and of controls by ELISA. Results were expressed as the mean \pm SEM from at least five animals per group. Asterisk(s) indicate statistical differences where * p < 0.05, ** p < 0.01.

tion for the IL-1 type I receptor (IL-1RI KO), the primary receptor for IL-1 β in the brain. They found that rats which received the IL-1 β infusion presented a decrease in the number of entries in the open arms whereas the IL-1RI KO mice reduced anxiety-like behavior in the EPM as indicated by increased time spent in the open arms. It has also been reported that cytokines, especially IL-1 β , administered systemically or directly into the brain influence the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) activity and affect norepinephrine release at different regions of the brain such as amygdala and paraventricular nucleus, all of which have been associated with anxiety [1]. These findings are in agreement with those found in this study and support an involvement of proinflammatory cytokines in anxiety-like behavior in CM.

This anxiety-like behavior induced by cytokines does not seem to be specific for PbA infection. For instance, previous works have demonstrated that systemic administration of lipopolysaccharide (LPS), a nonspecific activator of the immune system by influencing the release of inflammatory cytokines, provokes angiogenic-like response. It has been shown that mice receiving LPS intraperitoneally presented a significant decrease in the percentage (%) of time spent on the open arms and in the number of entries onto the open arms of the elevated plus maze, indicating an anxiety-like behavior [1,21,29].

It is worth mentioning that only one study have systematically investigated the occurrence of anxiety symptoms in CM patients

[8]. High levels of anxiety and depression were described in Ghanaian adults with *Falci-parum malaria* infection. Anxiety is probably underestimated in CM patients since more severe symptoms such as cognitive and motor dysfunction are also frequently found in this condition.

There are some limitations in the present study. The study is largely descriptive and does not show proof of causality. Other cytokines may be also involved in anxiety-like behavior. More studies are needed to describe with more details the anxiety-like behavior and its association with inflammatory changes and brain damage in CM.

In conclusion, we found that PbA-infected mice presented anxiety-like behavior symptoms and an increase of proinflammatory cytokine levels in the brain. These findings suggest an involvement of CNS inflammatory mediators in anxiety symptoms found in CM.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desen-

volvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBNet/FINEP), Brazil.

References

- [1] H. Anisman, Z. Merali, Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure, *Adv. Exp. Med. Biol.* 461 (1999) 199–233.
- [2] H. Armah, E.K. Wiredu, A.K. Doodoo, A.A. Adjei, Y. Tettey, R. Gyas, Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2 (2005) 123–131.
- [3] H. Brown, G. Turner, S. Rogerson, M. Tembo, J. Mwenchanya, M. Molyneux, T. Taylor, Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria, *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 1742–1746.
- [4] T.J. Connor, C. Song, B.E. Leonard, Z. Merali, H. Anisman, An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat, *Neuroscience* 84 (1998) 923–933.
- [5] A.B. Cragolini, H.B. Schiöth, T.N. Scimonelli, Anxiety-like behavior induced by IL-1b is modulated by a-MSH through central melanocortin-4 receptors, *Peptides* 27 (2006) 1451–1456.
- [6] J.B. De Souza, E.M. Riley, Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis, *Microbes Infect.* 4 (2002) 291–300.
- [7] M.S. Desruisseaux, M. Gulinello, D.N. Smith, S.C. Lee, M. Tsuji, L.M. Weiss, D.C. Spray, H.B. Tanowitz, Cognitive dysfunction in mice infected with plasmodium berghei strain ANKA, *J. Infect. Dis.* 197 (2008) 1–7.
- [8] A.T. Dugbartey, M.T. Dugbartey, M.Y. Apedo, Delayed neuropsychiatric effects of malaria in Ghana, *Nerv. Ment. Dis.* 186 (1998) 183–186.
- [9] S.E. File, Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse, *Behav. Brain Res.* 125 (2001) 151–157.
- [10] G.E. Grau, P.F. Piguet, H.D. Engers, J.Á. Louis, P. Vassali, P.H. Lambert, L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria, *J. Immunol.* 137 (1986) 2348–2354.
- [11] N.H. Hunt, J. Golenser, T. Chan-Ling, S. Parekh, C.R.S. Potter, I.M. Medana, J. Miu, H.J. Ball, Immunopathogenesis of cerebral malaria, *Int. J. Parasitol.* 36 (2006) 569–582.
- [12] N.H. Hunt, G.E. Grau, Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria, *Trends Immunol.* 24 (2003) 491–499.
- [13] R. Idro, N.E. Jenkins, C.R.J.C. Newton, Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria, *Lancet Neurol.* 4 (2005) 827–840.
- [14] V.M. Jennings, J.K. Actor, A.A. Lal, R.L. Hunter, Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis, *Infect. Immun.* 65 (1997) 4883–4887.
- [15] C.C. John, R.O. Opoka, J. Byarugaba, R. Idro, M.J. Boivin, Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria, *J. Infect. Dis.* 194 (2006) 837–845.
- [16] C.C. John, A. Panoskaltis-Mortari, R.O. Opoka, G.S. Park, P.J. Orchard, A.M. Jurek, R. Idro, J. Byarugaba, M.J. Boivin, Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78 (2008) 198–205.
- [17] J.W. Koo, R.S. Duman, Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory, *Neurosci. Lett.* 456 (2009) 39–43.
- [18] S. Kossodo, C. Monso, P. Juillard, T. Velu, M. Goldman, G.E. Grau, Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria, *Immunology* 91 (1997) 536–540.
- [19] N. Lacerda-Queiroz, D.H. Rodrigues, M.C. Vilela, A.S. Miranda, D.C.G. Amaral, E.R.S. Camargos, L.J.M. Carvalho, C.L. Howe, M.M. Teixeira, A.L. Teixeira, Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice, *Exp. Parasitol.* 125 (2010) 271–278.
- [20] P. Lackner, R. Beer, V. Heussler, G. Goebel, D. Rudzki, R. Helbok, E. Tannich, E. Schmutzhard, Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32 (2006) 177–188.
- [21] S. Lacosta, Z. Merali, H. Anisman, Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects, *Brain Res.* 818 (1999) 291–303.
- [22] K.E. Lyke, R. Burges, Y. Cissoko, L. Sangare, M. Dao, I. Diarra, A. Kone, R. Harley, C.V. Plowe, O.K. Doumbo, M.B. Szein, Serum levels of the proinflammatory cytokines Interleukin-1 beta (IL-1β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5630–5637.
- [23] R.G. Lister, The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* 92 (1987) 180–185.
- [24] J. Lou, R. Lucas, G.E. Grau, Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans, *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 810–820.
- [25] I.M. Medana, N.H. Hunt, G. Chaudhri, Tumor necrosis factor-α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 1473–1486.
- [26] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods* 14 (1985) 149–167.
- [27] P.A. Reis, C.M. Comim, F. Hermani, B. Silva, T. Barichello, A.C. Portella, F.C. Gomes, I.M. Sab, V.S. Frutuoso, M.F. Oliveira, P.T. Bozza, F.A. Bozza, F. Dal-Pizzol, G.A. Zimmerman, J. Quevedo, H.C. Castro-Faria-Neto, Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy, *Plos Pathog.* 6 (2010) 1–16.
- [28] R.W. Snow, C.A. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint, S.I. Hay, The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria, *Nature* 434 (2005) 214–217.
- [29] A.H. Swiergiel, A.J. Dunn, Effects of interleukin-1β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86 (2007) 651–659.
- [30] A.A. Walf, C.A. Frye, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 322–328.

Discussão

6- DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados com a cepa PbA apresentaram, no 6º dia após a infecção, alterações significativas em todos os parâmetros avaliados pela bateria de testes SHIRPA (Miranda *et al.*, 2010). Esse achado corrobora com estudos prévios que descreveram alterações significativas nos domínios funcionais da bateria SHIRPA, aproximadamente seis dias após a infecção com a cepa PbA (Lackner *et al.*, 2006; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010). A bateria SHIRPA tem sido descrita como uma importante ferramenta para prever a gravidade e a progressão da doença em modelos experimentais de MC, permitindo investigar os mecanismos envolvidos em períodos cruciais para o desenvolvimento da doença (Lackner *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2010). Adicionalmente, observamos um aumento significativo nas concentrações de glutamato no córtex cerebral e no líquido cefalorraquidiano dos camundongos infectados, paralelamente, aos sinais neurológicos e comportamentais encontrados (Miranda *et al.*, 2010). Em um estudo prévio conduzido por Rae *et al.* (2004) foi encontrado, utilizando-se a técnica de ressonância nuclear magnética, um aumento significativo nas concentrações de glutamato no cérebro de camundongos com MC no sexto dia após infecção com a cepa PbA. Em contrapartida, Sanni *et al.* (1998) demonstraram reduções significativas nas concentrações de glutamato encontradas no cérebro de camundongos que desenvolveram MC após infecção com a cepa PbA. Entretanto, diferenças nas metodologias empregadas podem justificar os resultados controversos obtidos. No presente estudo foi mensurada a liberação direta do glutamato na fenda sináptica por meio de espectrofluorímetro, enquanto que no estudo conduzido por Sanni *et al.* (1998) as concentrações de glutamato foram avaliadas por um método indireto, no caso a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em adição, processos excitotóxicos mediados por aminoácidos excitatórios, incluindo o ácido aspártico e o ácido quinoléico, que atuam por meio de receptores glutamatérgicos, têm sido implicados na

patogênese da MC humana e experimental (Dobbie *et al.*, 2000; Medana *et al.*, 2002; Sanni *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2004; Parekh *et al.*, 2006). No entanto, a contribuição dos mecanismos excitotóxicos bem como do glutamato para o desenvolvimento da MC permanece pouco elucidada (Rae *et al.*, 2004). Estudos que investiguem alterações nas vias de síntese, liberação e recaptção do glutamato no SNC bem como na expressão de seus receptores durante a MC podem contribuir para a compreensão do papel que esse neurotransmissor desempenha na patogênese da doença. Além disso, o uso de antagonistas de receptores de glutamato pode contribuir para minimizar os sintomas neurológicos e cognitivos encontrados na MC podendo atuar como adjuvante no tratamento convencional dessa condição.

Em outro estudo investigamos transtornos relacionados à ansiedade, alterações histopatológicas em diferentes regiões do encéfalo além da concentração de citocinas no tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa PbA. Este estudo demonstrou que camundongos com MC apresentaram altos níveis de ansiedade no 5º dia após a infecção associados ao aumento significativo das concentrações cerebrais de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e a alterações histopatológicas no tronco encefálico, córtex cerebral e hipocampo (Miranda *et al.*, 2011).

A ocorrência de alterações cognitivas e comportamentais associadas a processos neuroinflamatórios tem sido descrita em estudos clínicos e experimentais de MC (Desruisseaux *et al.*, 2008; John *et al.*, 2008; Lacerda-Queiroz *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010). Entretanto, apenas um estudo investigou a ocorrência de transtornos emocionais em pacientes com MC (Dugbartey *et al.*, 1998), demonstrando aumento significativo nos níveis de ansiedade e depressão em indivíduos adultos infectados com o *P. falciparum*. Os transtornos de ansiedade provavelmente são negligenciados nesses pacientes uma vez que sintomas considerados mais graves como alterações de memória, aprendizado e função motora são freqüentemente observados durante a MC. Dessa forma, o presente estudo é o primeiro a

investigar os transtornos de ansiedade em modelo experimental de MC bem como o possível envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na patogênese desse distúrbio.

Há evidências de que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias em especial IL-1 β e TNF- α , freqüentes em processos patológicos como a MC, podem contribuir para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Connor *et al.*, 1998; Anisman *et al.*, 1999; Cragolini *et al.*, 2006; Koo e Duman, 2009). Estudos prévios têm demonstrado que a administração sistêmica (intraperitoneal) ou central (intracerebroventricular) de IL-1 β e TNF- α induz aumento significativo nos níveis de ansiedade em roedores, indicado pela redução da porcentagem de tempo gasto e de entradas realizadas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Connor *et al.*, 1998; Anisman *et al.*, 1999; Cragolini *et al.*, 2006). Além disso, um estudo recente conduzido por Koo e Duman (2009) mensurou os níveis de ansiedade, utilizando o labirinto em cruz elevado, em ratos após a administração de IL-1 β no ventrículo lateral e em camundongos *knockout* para o receptor de IL-1. Os autores demonstraram aumento significativo dos níveis de ansiedade em ratos que receberam administração central de IL-1 β , indicado pela redução na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Em contra partida, níveis baixos de ansiedade foram encontrados nos camundongos *knockout* para o receptor de IL-1, indicados pelo aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Dessa forma, as evidências fornecidas por estes estudos apóiam os achados encontrados no presente trabalho, indicando um possível envolvimento das citocinas pró-inflamatórias na patogênese dos transtornos de ansiedade encontrados.

A produção sistêmica de IL-1 β e TNF- α durante processos infecciosos ou inflamatórios tem sido associada à ocorrência de um conjunto de alterações comportamentais, conhecido como “*sickness behavior*”, que incluem redução da atividade locomotora, distúrbios do sono e anorexia (Konsman *et al.*, 2002). No presente estudo não foi encontrada

alteração significativa da atividade locomotora, avaliada pelo número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto, indicando que os transtornos de ansiedade encontrados na MC estão associados a alterações no SNC e não apenas sistêmicas. O sistema imune periférico é capaz, por meio de vias neurais e humorais, de induzir a produção de citocinas no SNC (Konsman *et al.*, 2002). Há evidências de que as células da glia (astrócitos e micróglia), neurônios e células endoteliais constituem uma fonte importante de produção de TNF- α e IL-1 β no SNC de camundongos infectados com PbA (Medana *et al.*, 1997). Entretanto, a ansiedade não deve ser considerada um sintoma específico da MC. Estudos prévios têm demonstrado que a administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), um ativador inespecífico do sistema imune capaz de induzir a liberação de mediadores inflamatórios, pode provocar respostas ansiogênicas em camundongos (Lacosta e Anisman, 1999; Swiergiel e Dunn, 2007).

Alterações histopatológicas foram encontradas no tronco encefálico, córtex cerebral e hipocampo de camundongos com MC no 5º dia após a infecção com a cepa PbA. Foi observado o seqüestro de leucócitos na microvasculatura do córtex cerebral, tronco encefálico e hipocampo, além de hemorragias multifocais no tronco encefálico. Esses achados estão de acordo com o descrito em estudos prévios que demonstraram, por meio de análises histopatológicas, a presença de infiltrado celular, hemorragias e alterações vasculares em diferentes regiões do encéfalo de camundongos infectados com a cepa PbA, incluindo córtex cerebral, cerebelo, tronco encefálico e hipocampo (Lackner *et al.*, 2006; Desruisseaux *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010). Além disso, foi encontrado, especificamente na região CA1 do hipocampo dos animais infectados, morte dos neurônios piramidais em comparação a mesma região observada nos animais sem infecção. Alterações significativas na região CA1 do hipocampo foram encontradas em camundongos *knockout* para o receptor de

serotonina 5-HT1A que apresentaram transtornos de ansiedade, indicando o envolvimento dessa região na patogênese desse distúrbio (Freeman-Daniels *et al.*, 2007).

Mediante o exposto, é possível concluir que camundongos infectados com a cepa PbA apresentam amplo espectro de alterações neurológicas e comportamentais no 6º dia após a infecção que estão associadas a um aumento significativo nas concentrações de glutamato no SNC. Além disso, os camundongos com MC apresentam altos níveis de ansiedade no 5º dia após a infecção, além de alterações histopatológicas em diferentes regiões do encéfalo, em especial na região CA1 do hipocampo, e aumento significativo nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias no SNC. Os resultados encontrados sugerem que o glutamato pode desempenhar um importante papel na patogênese da MC e que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias no SNC, em especial IL-1 β e TNF- α , durante a infecção, pode contribuir significativamente para o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade observados nos camundongos com MC.

Alterações cognitivas, em especial relacionadas à memória e ao aprendizado, têm sido descritas em estudos clínicos e experimentais de MC. Entretanto, a maioria dos estudos experimentais não investigou, especificamente no hipocampo, os processos histopatológicos, inflamatórios e neuroquímicos envolvidos na patogênese desses transtornos cognitivos, durante a MC. Dessa forma, em estudos futuros pretendemos, utilizando o modelo experimental de MC por PbA, caracterizar, por meio de testes padronizados, os distúrbios cognitivos associados a memória e ao aprendizado, bem como investigar os fatores responsáveis por esses transtornos, focando principalmente o estudo de regiões hipocâmpais.

Conclusões

7 – CONCLUSÕES

* Camundongos infectados com a cepa PbA apresentam, no 6º dia após a infecção, alterações significativas em todos os domínios funcionais avaliados pela bateria SHIRPA.

* Ocorre, no 6º dia após a infecção com a cepa PbA, um aumento significativo da liberação cortical de glutamato, dependente e independente de Ca^{2+} , e da concentração de glutamato no líquido cefalorraquidiano dos camundongos infectados.

* Os camundongos com MC apresentam, no 5º dia após a infecção com a cepa PbA, altos níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado em comparação com os animais não infectados.

* Diferente dos camundongos não infectados, camundongos com MC apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , no tecido cerebral, no 5º dia após a infecção com a cepa PbA.

* O aumento significativo de glutamato no SNC dos camundongos infectados possivelmente está associado à ocorrência das alterações neurológicas e comportamentais observadas na bateria de testes SHIRPA.

* A produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-1 β , durante a MC parece ser relevante para o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade encontrados nos camundongos infectados.

Referências

8 – REFERÊNCIAS

1. Adams S, Brown H, Turner G. Breaking down the blood brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 2002; 18: 360-366.
2. Amani V, Vigario AM, Belnoue E. Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1646–1655.
3. Anisman H, Merali Z. Anhedonic and anxiogenic effects of cytokine exposure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 461: 199–233.
4. Armah H, Wiredu EK, Dodoo AK, Adjei AA, Tettey Y, Gyas R. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2005; 2: 123–131.
5. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, Adjei AA, Gyasi RK, Tettey Y, Wiredu EK, Tongren JE, Udhayakumar V, Stiles JK. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J.* 2007; 6: 147-164.
6. Bano N, Romano JD, Jayabalasingham B, Coppens I. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 1329–1341.
7. Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigário AM. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun.* 2010; 78: 4033-4039.
8. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, Viguier M, Snounou G, Rénia L. On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 2002; 169: 6369–6375.
9. Belnoue E, Potter SM, Rosa DS, Mauduit M, Grüner AC, Kayibanda M, Mitchell AJ, Hunt NH, Rénia L. Control of pathogenic CD8⁺ T cell migration to the brain by IFN- γ during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 2008; 30: 544–553.
10. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagegga G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate

- release via TNF-alpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci.* 2001; 4: 702–710.
11. Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, John CC. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. *Pediatrics.* 2007; 119: e360-e366.
 12. Breman JG. The intolerable burden of Malaria: A new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64: 1-7.
 13. Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Taylor T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1742–1746.
 14. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Franco Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002; 134: 49–57.
 15. Combes V, De Souza JB, Rénia L, Hunt NH, Grau GE. Cerebral malaria: Which parasite? Which model? *Inflammation and Infectious Disease.* 2005; 2: 141-147.
 16. Connor TJ, Song C, Leonard BE, Merali Z, Anisman H. An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience.* 1998; 84: 923–933.
 17. Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN. Anxiety-like behavior induced by IL-1b is modulated by a-MSH through central melanocortin-4 receptors. *Peptides.* 2006; 27: 1451–1456.
 18. Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, Desruisseaux MS. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* 2010; 12: 1198-1207.
 19. De Souza JB, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 2002; 4: 291–300.

20. Desruisseaux MS, Gulinello M, Smith DN, Lee SC, Tsuji M, Weiss LM, Spray DC, Tanowitz HB. Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA. *J Infect Dis.* 2008; 197: 1-7.
21. Dobbie M, Crawley J, Waruiru C, Marsh K, Surtees R. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 284-290.
22. Dugbartey AT, Dugbartey MT, Apedo MY. Delayed neuropsychiatric effects of malaria in Ghana. *Nerv Ment Dis.* 1998; 186: 183-186.
23. Engwerda CR, Mynott TL, Sawhney S, de Souza JB, Bickle QD, Kaye PM. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumour necrosis factor alpha is the principal mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med.* 2002; 195: 1371-1377.
24. Ferguson AR, Christensen RN, Gensel JC, Miller BA, Sun F, Beattie EC, Bresnahan JC, Beattie MS. Cell death after spinal cord injury is exacerbated by rapid TNF alpha-induced trafficking of GluR2-lacking AMPARs to the plasma membrane. *J Neurol Sci.* 2008; 28: 11391-11400.
25. File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res.* 2001; 125: 151-157.
26. Freeman-Daniels E, Beck SG, Kirby LG. Cellular correlates of anxiety in CA1 hippocampal pyramidal cells of 5-HT(1A) receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2010; DOI: 10.1007/s00213-010-2030-5.
27. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda C. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 69-99.
28. Grau GE, Piguet PF, Engers HD, Louis JA, Vassalli P, Lambert PH. L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Immunol.* 1986; 137: 2348-2354.
29. Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem.* 2001; 78: 842-853.

30. Ho M, Sexton MM, Tongtawe P, Looareesuwan S, Suntharasamai P, Webster HK. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 1995; 172: 838–844.
31. Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Potter CRS, Medana IM, Miu J, Ball HJ. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 569–582.
32. Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 2003; 24: 491-499.
33. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJC. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* 2005; 4: 827–840.
34. Irwin S. Comprehensive observational assessment: 1a. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology.* 1968; 13: 222–257.
35. Jennings VM, Actor JK, Lal AA, Hunter RL. Cytokine Profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun.* 1997; 65: 4883–4887.
36. John CC, Panoskaltis-Mortari A, Opoka RO, Park GS, Orchard PJ, Jurek AM, Idro R, Byarugaba J, Boivin MJ. Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78: 198–205.
37. John CC, Opoka RO, Byarugaba J, Idro R, Boivin MJ. Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2006; 194: 837–845.
38. Kihara M, Carter JA, Newton CRJC. The effect of *Plasmodium falciparum* on cognition: a systematic review. *Trop Med Int Health.* 2006; 11: 386–397.
39. Konsman JP, Patricia P, Robert D. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implication. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 154-159.
40. Koo JW, Duman RS. Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory. *Neurosci Lett.* 2009; 456: 39–43.

41. Kossodo S, Grau GE: Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol.* 1993; 151: 4811-4820
42. Kossodo S, Monso C, Juillard P, Velu T, Goldman M, Grau GE. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology.* 1997; 91: 536-540.
43. Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos ER, Carvalho LJ, Howe CL, Teixeira MM, Teixeira AL. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 271-278.
44. Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006; 32: 177-188.
45. Lacosta S, Merali Z, Anisman H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res.* 1999; 818: 291-303.
46. Lalonde R, Dumont M, Staufienbiel M, Strazielle C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 2005; 10; 157: 91-98.
47. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010; 460: 525-542.
48. Lau AA, Crawley AC, Hopwood JJ, Hemsley KM. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behavioral Brain Research.* 2008; 191: 130-136.
49. Leonoudakis D, Braithwaite SP, Beattie MS, Beattie EC. TNF α -induced AMPA-receptor trafficking in CNS neurons; relevance to excitotoxicity? *Neuron Glia Biol.* 2004; 1: 263-273.
50. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of Cerebral Malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 810-820.
51. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB. Serum Levels of the proinflammatory cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-

- 12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun.* 2004; 72: 5630–5637.
52. Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BPT, Andrade BG, Souza TM, Souza DO, Daniel-Ribeiro CT. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malar J.* 2010; 9: 1-13.
53. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: Evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1473-1486.
54. Medana IM, Hien TT, Day NP, Phu NH, Mai NT, Chu'ong LV, Chau TT, Taylor A, Salahifar H, Stocker R, Smythe G, Turner GD, Farrar J, White NJ, Hunt NH. The clinical significance of cerebrospinal fluid levels of kynurenine pathway metabolites and lactate in severe malaria. *J Infect Dis.* 2002; 185: 650-656.
55. Medana IM, Turner GDH. Human cerebral malaria and the blood–brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 555–568.
56. Medana IM, Day NP, Salahifar-Sabet H, Stocker R, Smythe G, Bwanaisa L, Njobvu A, Kayira K, Turner GD, Taylor TE, Hunt NH. Metabolites of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in the cerebrospinal fluid of Malawian children with malaria. *J Infect Dis.* 2003; 188: 844–849.
57. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000; 130: 1007S-1015S.
58. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002; 415: 673-679.
59. Ministério da Saúde, 2005. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>.
60. Miranda AS, Lacerda-Queiroz N, Rachid MA, Teixeira AL. Sintomas neurológicos agudos e residuais na malária. *Rev Bras Neurol.* 2010; 46: 35-41.
61. Miranda AS, Lacerda-Queiroz N, Vilela MC, Rodrigues DH, Rachid MA, Quevedo J, Teixeira AL. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). *Neurosci Lett.* 2011, DOI:10.1016/j.neulet.2011.01.038.

62. Miranda AS, Vieira LB, Lacerda-Queiroz N, Souza AH, Rodrigues DH, Vilela MC, Gomez MV, Machado FS, Rachid MA, Teixeira AL. Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43: 1173-1177.
63. Mung'ala-odera V, Snow RW, Newton CRJC. The burden of the neurocognitive impairment associated with *Plasmodium Falciparum* malaria in sub-saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71: 64-70.
64. Murphy SC, Breman JG. Gaps in the childhood malaria burden in africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64: 57-67.
65. Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology.* 2005; 130: S45-S62.
66. Newton CRJC, Hien TT, White N. Neurological aspects of tropical disease: cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; 69: 433-441.
67. Ntcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D, Combadiere B. Perforin-dependent braininfiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol.* 2003; 170: 2221-2228.
68. Parekh SB, Bubb WA, Hunt NH, Rae C. Brain metabolic markers reflect susceptibility status in cytokine gene knockout mice with murine cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 1409-1418.
69. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002; 68: 311-323.
70. Pickering M, O'Connor JJ. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2007; 163: 339-354.
71. Prado MAM, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*. *Biochem J.* 1996; 314: 145-150.

72. Rae C, Mcquillan JA, Parekh SB, Bubb WA, Weiser S, Balcar VJ, Hansen AM, Ball HJ, Hunt NH. Brain gene expression, metabolism, and bioenergetics: interrelationships in murine models of cerebral and noncerebral malaria. *FASEB J*. 2004; 18: 499-510.
73. Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, Gomes FC, Sab IM, Frutuoso VS, Oliveira MF, Bozza PT, Bozza FA, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *Plos Pathog*. 2010; 6: 1-16.
74. Rénia L, Potter SM, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, Deschemin JC, Snounou G, Grüner AC. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol*. 2006; 36: 547–554.
75. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*. 1997; 8: 711-713.
76. Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett*. 2001; 22; 306: 89-92.
77. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 2002; 415: 680-685.
78. Sanni LA, Rae C, Maitland AM, Stocker R, Hunt NH. Is ischaemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? *Am J Pathol*. 2001; 159: 1105–1112.
79. Sanni LA, Thomas SR, Tattam BN, Moore DE, Chaudhri G, Stocker R, Hunt NH. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and non-cerebral malaria. *Am J Pathol*. 1998; 152: 611–619
80. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005; 434: 214–217.
81. Souza AH, Ferreira J, Cordeiro MN, Vieira LB, De Castro CJ, Trevisan G, Reis H, Souza IA, Richardson M, Prado MA, Prado VF, Gomez MV. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Phal1b toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*. 2008; 140: 115-126.

82. Staub F, Mackert B, Kempfski O, Peters J, Baethmann A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J Neurol Sci.* 1993; 119: 79–84.
83. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J Neurol Sci.* 2005; 25: 3219–3228.
84. Stone TW, Behan WM, Jones PA, Darlington LG, Smith RA. The role of kynurenines in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. *J Alzheimer's Dis.* 2001; 3: 355–366.
85. Stone TW, Mackay GM, Forrest CM, Clark CJ, Darlington LG. Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 852–859.
86. Swiergiel AH, Dunn AJ. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 86: 651–659.
87. Takahashi A, Kato K, Makino J, Shiroishi T, Koide T. Multivariate analysis of temporal descriptions of Open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behav Genet.* 2006; 36: 763-774.
88. Van de Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 503-508.
89. Viviani B, Gardoni F, Marinovich M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82: 247–263.
90. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007; 2: 322-328.
91. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.* 2010; 15:1382-1402.
92. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 172-173.

93. White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol.* 2010; 26: 11-15.
94. World Health Organization (WHO). Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: 1–90.
95. World Health Organization (WHO). World Malaria Report 2009.
96. Yanez DM, Manning DD, Cooley AJ, Weidanz WP, van der Heyde HC. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol.* 1996; 157: 1620–1624.
97. Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammeda AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 2006; 169: 10–20.

Anexo

ANEXO A

Outros artigos publicados durante o mestrado.

A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57BL/6 mice

A behavioral and neurochemical study

Aline Silva de Miranda¹, David Henrique Rodrigues¹,
Luciene Bruno Vieira², Cristiano Xavier Lima¹, Milene Alvarenga Rachid¹,
Paula Vieira Teixeira Vidigal³, Marcus Vinicius Gomez⁴,
Helton José dos Reis², Cristina Guatimosim³, Antônio Lúcio Teixeira¹

ABSTRACT

Objective: Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome resulting from liver failure. In the present study, we aimed to standardize an animal model of HE induced by thioacetamide (TAA) in C57BL/6 mice evaluating behavioral symptoms in association with liver damage and alterations in neurotransmitter release. **Method:** HE was induced by an intraperitoneal single dose of TAA (200 mg/kg, 600 mg/kg or 1,200 mg/kg). Behavioral symptoms were evaluated using the SHIRPA battery. Liver damage was confirmed by histopathological analysis. The glutamate release was measured using fluorimetric assay. **Results:** The neuropsychiatric state, motor behavior and reflex and sensory functions were significantly altered in the group receiving 600 mg/kg of TAA. Biochemical analysis revealed an increase in the glutamate release in the cerebral cortex of HE mice. **Conclusion:** HE induced by 600mg/kg TAA injection in C57BL/6 mice seems to be a suitable model to investigate the pathogenesis and clinical disorders of HE.

Key words: hepatic encephalopathy, thioacetamide, behavioral changes, SHIRPA, glutamate.

Modelo de encefalopatia hepática induzida por tioacetamida em camundongos C57BL/6: estudo comportamental e neuroquímico

RESUMO

Objetivo: A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica resultante da falência hepática. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo de EH induzida por tioacetamida (TAA) em camundongos C57BL/6 avaliando transtornos comportamentais, falência hepática e alterações na liberação de neurotransmissores. **Método:** A EH foi induzida por meio de uma única dose intraperitoneal de TAA (200 mg/kg, 600 mg/kg, 1.200 mg/kg). As alterações comportamentais foram avaliadas utilizando a bateria SHIRPA. A falência hepática foi confirmada através de análises histopatológicas e a liberação de glutamato medida, por ensaio fluorimétrico. **Resultados:** Foram encontradas alterações significativas no estado neuropsiquiátrico, comportamento motor e função reflexa e sensorial no grupo que recebeu 600 mg/kg de TAA. Análises bioquímicas revelaram aumento na liberação de glutamato no córtex cerebral dos camundongos com EH. **Conclusão:** A EH induzida por 600 mg/kg de TAA em camundongos C57BL/6 parece ser um modelo apropriado para a investigação da patogênese e dos transtornos clínicos da EH. **Palavras-chave:** encefalopatia hepática, tioacetamida, alterações comportamentais, SHIRPA, glutamato.

Correspondence

Antonio Lucio Teixeira
Departamento de Clínica Médica,
Faculdade de Medicina, UFMG
Avenida Alfredo Balena 190
30130-100 Belo Horizonte MG - Brasil
E-mail: altexr@gmail.com

Support

This work was supported by Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN Net/Finep), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Brazil

Received 27 January 2010
Received in final form 23 March 2010
Accepted 07 April 2010

Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brazil: ¹Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences; ²Laboratory of Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences; ³Department of Morphology, Institute of Biological Sciences; ⁴Laboratory of Molecular Medicine (INCT), School of Medicine.

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome resulting from acute or chronic liver failure¹. HE affects a considerable number of patients worldwide with a mortality index ranging from 50 to 90%². This condition can cause a wide range of clinical manifestations which include psychomotor dysfunction, sensory abnormalities, poor concentration, impaired memory and increased reaction time. In its most severe form, patients may develop stupor, coma and death¹.

The pathogenesis of HE is still not well understood. The main hypothesis suggests a state of hyperammonemia which is responsible for both direct and indirect alterations in cerebral metabolism³. Hyperammonemia leads to increased levels of glutamine in astrocytes from amidation of glutamate by glutamine synthetase⁴. The accumulation of glutamine in the astrocytes produces osmotic stress and causes the astrocytes to swell. This could determine cerebral edema and intracranial hypertension which are ascribed to be the main pathophysiological features of HE⁵. Other mechanisms have been proposed to explain the pathogenesis of HE, including dysfunction of the immune⁵ and neurotransmitter⁶ systems. Therefore, it is important to clarify the mechanisms by which factors associated with liver failure affect cerebral function and animal models are of relevance in the investigation of the underlying mechanisms of HE^{7,8}.

Many drugs have been used to induce liver failure in experimental models, such as thioacetamide (TAA), D-galactosamine, acetaminophen, carbon tetrachloride and concanavalin A⁹. TAA is a hepatotoxin frequently used in experimental studies due to its efficacy in inducing hepatic failure in rodents^{10,11}. Following hepatic failure, TAA is able to induce HE^{8,12}. Most studies using TAA were performed in rats^{8,13}. The best dose of TAA to induce HE in mice is still not well established.

Experimental HE has been defined using only severe neurological signs, such as coma followed by death¹³. Some studies have evaluated a few cognitive domains using standardized tests^{8,14,15}. However, these parameters may be too restrictive as the HE encompasses a wide range of clinical manifestations. In this context, it is important to use a validated battery of tests that can evaluate several behavioral functions.

In the present study, we aimed to standardize an animal model of HE induced by TAA in C57BL/6 mice evaluating a large spectrum of behavioral symptoms as assessed by the SHIRPA battery, glutamate release from brain cortical isolated nerve terminals and liver damage.

METHOD

Animals

All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais

(UFMG). Sixty Male C57BL/6 mice (20-25g), aged 8-12 weeks, were obtained from Animal Care Facilities of the Institute of Biological Sciences, UFMG. Thirty six mice were used to induce HE and twenty four were used as controls.

Induction of hepatic encephalopathy

HE was induced by an intraperitoneal single dose of TAA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). We tested the following doses: 200 mg/kg, 600 mg/kg and 1,200 mg/kg of TAA dissolved in saline (NaCl 0.9%; 0.3 mL). Controls received the same volume of saline. Survival curve and weight of animals using these three doses of TAA were evaluated daily until 8th and 6th day post-induction (p.i), respectively.

Histological analysis

Livers were removed immediately from mice after cervical dislocation at 48h p.i. and fixed in 10% buffered formalin. The sections (5.0 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed in an Olympus BX51 microscope. Six liver sections from each animal were used for this analysis. Liver damage was also evaluated by transaminase activity, glutamic oxalacetic (GOT) and glutamic pyruvic (GPT) in sera from mice using standard kits (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil).

SHIRPA screen

Behavioral and functional parameters were evaluated using a screening battery called SHIRPA until 3rd day p.i. The SHIRPA screen was conceived as a multi-test behavioral battery used for longitudinal studies with standardized guidelines and materials¹⁶. This battery encompasses a wide range of tests, organized in five functional categories: neuropsychiatric state, motor behavior, reflex and sensory function, autonomous function and muscle tone and strength¹⁷. Animals were allowed to accommodate to their new environment for 2 days before behavioral assessment.

Glutamate release and measurement

Synaptosomes were prepared as previously described¹⁸. Mice were decapitated and had their cortices removed and homogenized in 1:10 (w/v) 0.32M sucrose solution containing dithiothreitol (0.25 mM) and EDTA (1 mM). Homogenates were then submitted to low-speed centrifugation (1000g / 10 min) and isolated nerve terminals (synaptosomes) were purified from the supernatant by discontinuous Percoll-density gradient centrifugation¹⁹. The synaptosomes were resuspended in Krebs-Ringer-HEPES solution (KRH, 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM glucose, 25 mM HEPES, pH 7.4) with no added CaCl₂, to a concentration of approximately 10 mg/mL, divided into aliquots of 200 µL and kept on ice for posterior measurement of glutamate release. The

glutamate release assay was performed using a RF5301-PC spectrofluorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan) following the increase in the fluorescence due to the production of NADPH⁺ in the presence of glutamate dehydrogenase and NADP^{+20,21}.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison post-test was used to analyze behavioral and functional categories of SHIRPA and the serum levels of GOT and GPT. To analyze the survival rate, the Logrank test was used. The glutamate release was analyzed using the unpaired t-student test. All analyses were performed using Prism 4 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

First, we evaluated survival rate using three different doses of TAA. We found that 200 mg/kg and 600 mg/kg doses lead to a higher survival rate ($p \leq 0.01$) in comparison

with 1,200 mg/kg (Fig 1A). All animals exhibited a decrease in body weight after TAA injection and start recovering at day 3 p.i. (Fig 1B). Due to the high mortality rate associated with the dose of 1,200 mg/kg, behavioral and functional parameters were assessed with the other two doses.

The neuropsychiatric state ($p=0.02$), motor behavior ($p=0.03$), reflex and sensory function ($p=0.03$) from the SHIRPA battery were significantly altered in the group receiving 600mg/kg of TAA in comparison with animals receiving saline (Fig 2). No difference was found between the group receiving 200 mg/kg of TAA and controls. Thus, the dose of 600 mg/kg seemed to be the most appropriate to induce HE in mice.

To confirm liver damage induced by 600 mg/kg of TAA, we performed histological analyses at 48h p.i. An extensive hemorrhagic necrotic area was found in TAA injected mice compared to controls (Figs 3A, 3B). Serum levels of GOT and GPT were significantly increased after 24h and 48h ($p \leq 0.01$) (Fig 3C, 3D), confirming the extensive liver damage.

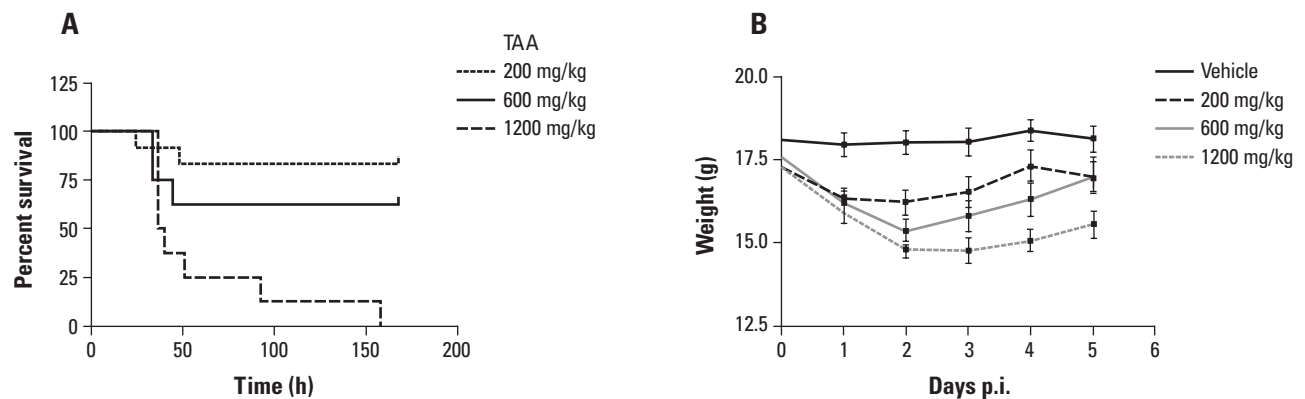


Fig 1. Survival curve [A] and weight [B] were evaluated daily until 8th and 6th day post-induction (p.i), respectively. Three different concentrations of thioacetamide were used to induce hepatic encephalopathy in the C57BL/6 wild type mice: 200 mg/kg (n=12), 600 mg/kg (n=12) and 1200 mg/kg (n=12).

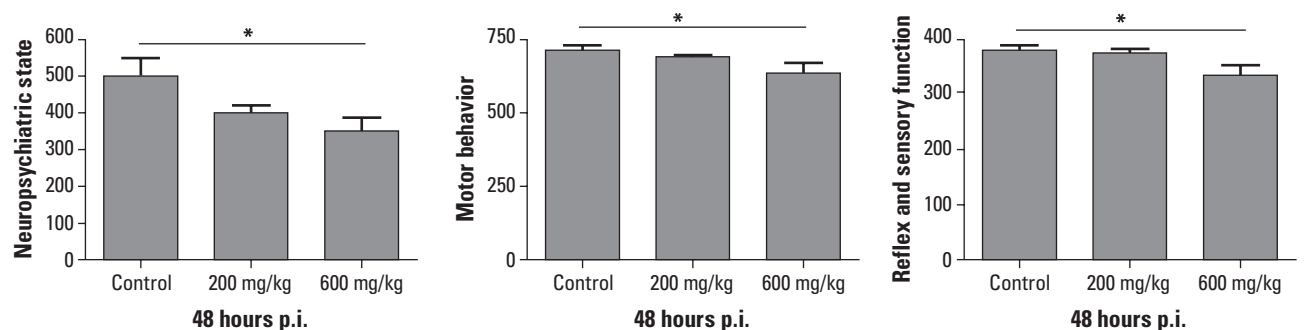


Fig 2. Performance of C57BL/6 mice hepatic encephalopathy induced with 200 mg/kg (n=10) and 600 mg/kg (n=6) of thioacetamide at 48 hours post-induction and of control group (n=6) in the functional categories of the SHIRPA battery. Data are presented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

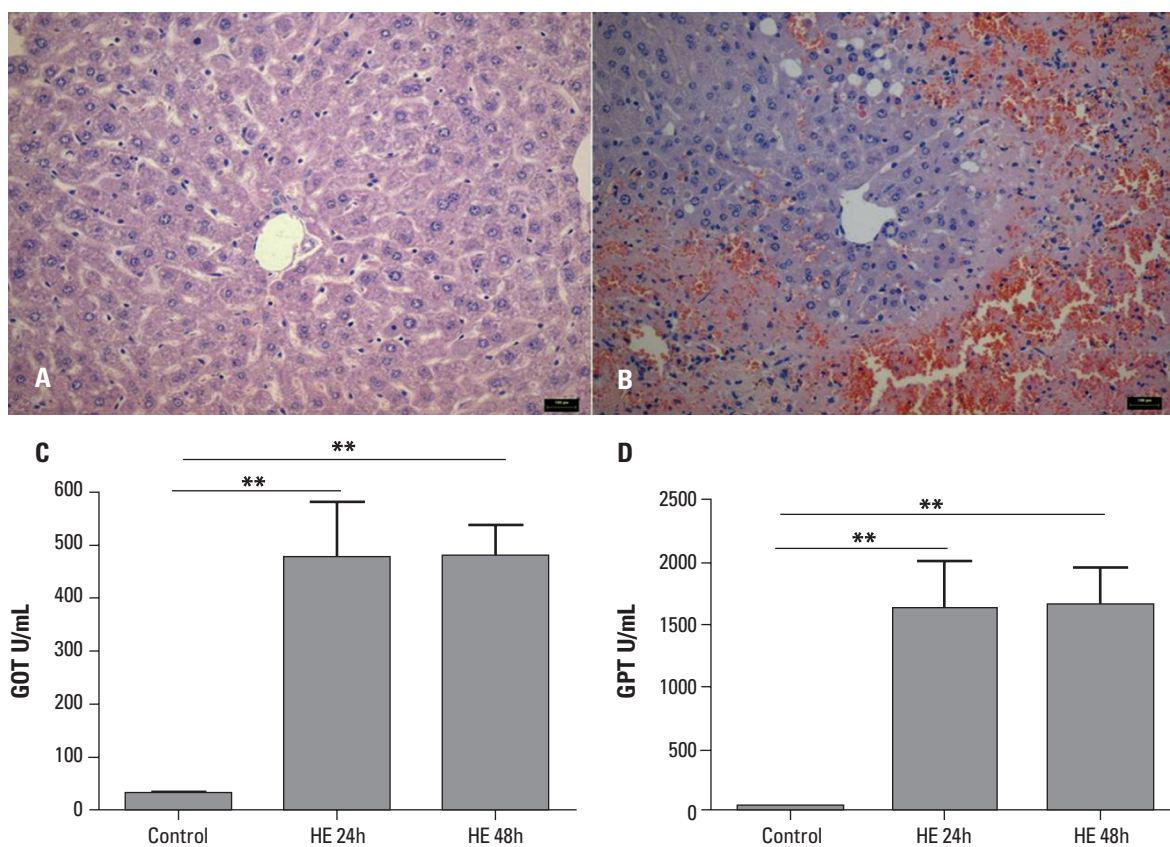


Fig 3. Liver damage following injection of 600 mg/kg of thioacetamide. Histological section (5 μ m) of liver from control mice (n=3) with normal portal triad and hepatocytes [A]. The liver from hepatic encephalopathy mice (n=5) induced with 600 mg/kg of thioacetamide exhibits intense periacinar hemorrhagic necrosis with preservation of periportal zone [B]. The serum levels of GOT [C] and GPT [D] were assessed in hepatic encephalopathy group and in control group (n=11) at 24h (n=6) and 48h (n=10) post-induction. Data are presented as mean \pm SEM. **p \leq 0.01.

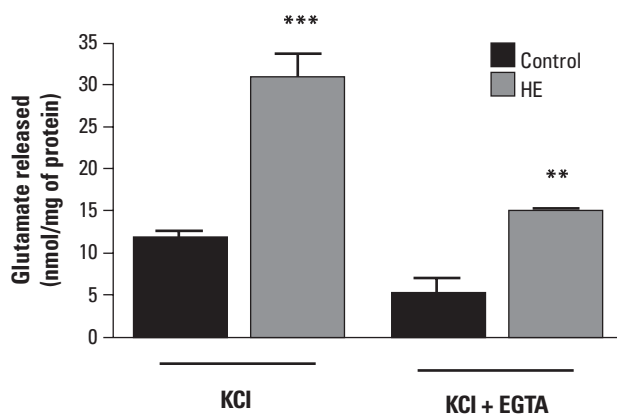


Fig 4. HE induces glutamate release from brain synaptosomes. First bar: 33 mM KCl-evoked glutamate release from C57BL/6 mice; Second bar: 33 mM KCl-evoked glutamate release from C57BL/6 mice with hepatic encephalopathy induced with 600 mg/kg of thioacetamide at 72 hours post-induction; Third bar: Calcium-independent glutamate release evoked by 33 mM KCl from C57BL/6 mice synaptosomes. Forth bar: Calcium-independent glutamate release evoked by 33 mM KCl from C57BL/6 mice with hepatic encephalopathy induced with 600 mg/kg of thioacetamide at 72 hours post-induction. The results are mean \pm SEM of at least three independent experiments for each experimental condition. **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001.

All neurological functions altered in HE seem to be the final result of changes in neurotransmission. Considering that abnormal glutamatergic neurotransmission was previously reported in HE, we measured glutamate release from brain cortical isolated nerve terminals (synaptosomes) in our HE model. We observed that glutamate release was significantly increased in the group receiving 600 mg/kg of TAA in comparison with animals receiving saline (Fig 4). Synaptosomes from control animals were exposed to 33 mM KCl to depolarize their membranes and induce glutamate release (Fig 4). KCl-evoked glutamate release from synaptosomes obtained from HE animals was approximately three fold higher than control animals (Fig 4; **p \leq 0.01).

When synaptosomes were depolarized with KCl, the release of glutamate is the sum of two components: one that is extracellular calcium dependent and inhibited by the calcium chelator EGTA, and a second which is extracellular calcium independent and not sensitive to EGTA. We therefore measured KCl-evoked glutamate release in control and HE mice synaptosomes in the presence of EGTA which reflects the calcium-independent pool. In

both conditions (control and HE mice), KCl-evoked glutamate release was reduced in the presence of EGTA (Fig 4; *** $p \leq 0.001$).

DISCUSSION

In this study, the administration of 600 mg/kg of TAA was capable of inducing severe liver damage evidenced by histopathological analysis and increased serum levels of hepatic enzymes. These hepatic alterations were accompanied by neuropsychiatry, motor, reflex and sensory changes. Moreover, increased glutamate release was observed in the cerebral cortex of HE animals.

HE has been largely studied in rat models^{12,14,22}. In mice, most studies using TAA have been performed to evaluate acute or chronic liver failure and not changes in the central nervous system^{10,23,24}. Indeed, histopathological changes observed in the liver were similar to those described in previous studies. To the best of our knowledge, only few studies have used mice as an experimental model of HE. Avraham et al. investigated neurological functions in a HE model using a dose of 200 mg/kg of TAA in the Sabra mouse strain⁸. We could not find significant neuropsychiatric and motor changes using this dose of TAA, indicating that different mice strains may present distinct susceptibility to the drug.

In the present study, using C57BL/6 mice we found significant changes in the reflex and sensory function, motor and neuropsychiatric state using SHIRPA battery. Other studies have also evaluated some behavioral changes of HE using different neurological and cognitive protocols. Similar to our study, they found significant alterations in motor behavior, reflex and cognitive function^{8,15,25}. However no previous study used a broad behavioral battery such as SHIRPA to evaluate the clinical manifestations of HE. The present results and previous data with SHIRPA in other neurological conditions, such as cerebral malaria¹⁷, suggest this battery seem to be an efficient tool to identify subtle behavioral changes in HE.

Neurotransmitters, such as glutamate, have been implicated in the pathogenesis of HE²⁶⁻²⁸. In our study, we found a significant increase of glutamate release in the cortex of HE mice, corroborating the view that glutamate release plays a role in the pathogenesis of HE. Indeed, previous studies in rodents showed that glutamate could mediate neurological symptoms of HE. For instance, Moroni et al. have demonstrated an increase in the synthesis and release of glutamate in rats using two different models of HE (ammonium acetate and portacaval anastomosis)²⁶. Also, McArdle et al., using a TAA-induced HE model in rats, found increased extracellular levels of glutamate in hippocampus²⁷. We also observed that KCl-evoked glutamate release from synaptosomes obtained from HE mice was partially inhibited by EGTA

(approximately 50% inhibition compared to control, Fig 4). Previous work performed by Minelli et al. showed that alkalization increases Ca^{2+} release through intracellular stores and induces plasmalemmal calcium influx in microglia culture²⁹. We could therefore suggest that the increase in KCl-evoked glutamate release observed in our experiments with HE mice synaptosomes might be due to a direct effect of ammonia or other mediator.

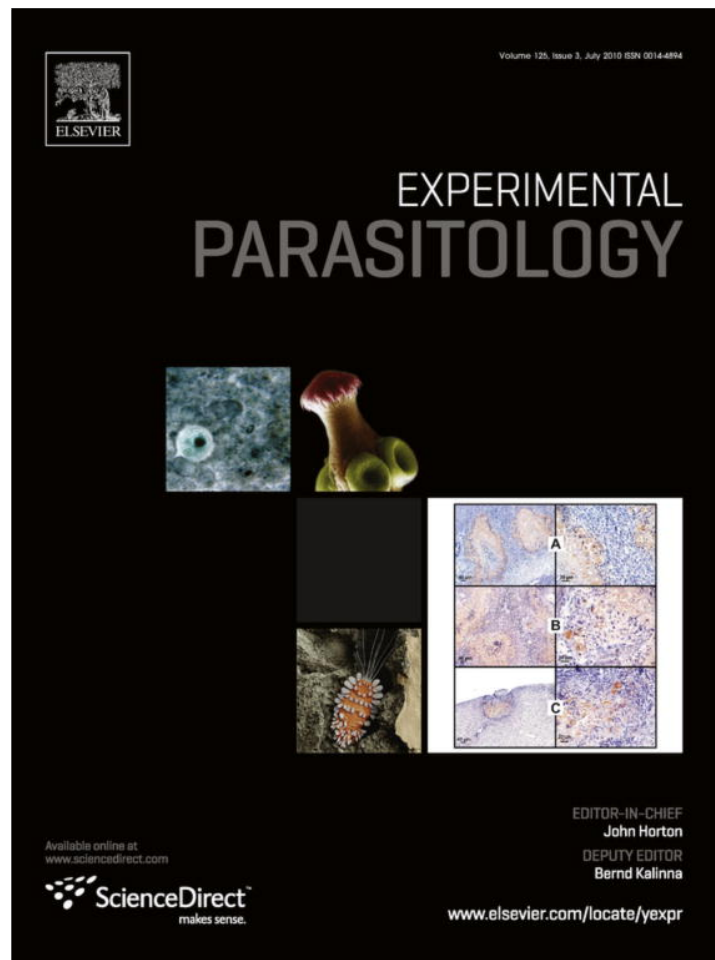
In conclusion, we standardized a HE model using 600 mg/kg of TAA in C57BL/6 mice. Due to the low mortality and clear neuropsychiatric and motor dysfunctions, this could be a useful model to study the pathogenesis and clinical disorders of HE. It is worth mentioning that the use of the C57BL/6 strain has several technical advantages. One is the high availability of knock out mice, which could contribute to the study of the mechanisms underlying this condition. Another advantage is that C57BL/6 is an inbred strain. Thus, HE model using C57BL/6 mice may account for less variability in experimental studies.

REFERENCES

1. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy: definition, nomenclature, diagnosis and quantification. Final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716-721.
2. Raghavan M, Marik PE. Therapy of intracranial hypertension in patients with fulminant hepatic failure. *Neurocrit Care* 2006;4:179-189.
3. Rose C. Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metab Brain Dis* 2002;17:251-261.
4. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab Brain Dis* 2002;17:221-227.
5. Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2295-2304.
6. Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Cremer M, et al. Neurotransmitter receptor imbalances in motor cortex and basal ganglia in hepatic encephalopathy. *Cell Physiol Biochem* 2009;24:291-306.
7. Bélanger M, Côté J, Butterworth RF. Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochem Int* 2006;48:434-440.
8. Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, et al. Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiol Dis* 2006;21:237-245.
9. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81:145-157.
10. Wang CH, Javan B, Lee TH, et al. Single injection of naked plasmid encoding alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:153-161.
11. Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 2004;368:15-20.
12. Chu CJ, Chen CT, Wang SS, et al. Hepatic encephalopathy in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure: role of endotoxin and tumor necrosis factor- α . *Chin Med J* 2001;64:321-330.
13. Dagon Y, Avraham Y, Ilan Y, Mechoulam R, Berry EM. Cannabinoids ameliorate cerebral dysfunction following liver failure via AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 2007;21:2431-2441.
14. Bémeur C, Qu H, Desjardins P, Butterworth RF. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 2010;56:213-215.
15. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Associative learning deficit in two experimental models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 2009;198:346-351.

16. Sarhan S, Knödgen B, Grauffel C, Seiler N. Effects of inhibition of ornithine aminotransferase on thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy. *Neurochem Res* 1993;18:539-549.
17. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 1997;8:711-713.
18. Lackner P, Beer R, Heussler V, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:177-188.
19. Romano-Silva MA, Ribeiro-Santos R, Ribeiro AM, et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for calcium entry linked to rapid glutamate release: studies using Phneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J* 1993;296:313-319.
20. Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, Rostas JA. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 1988;441:59-71.
21. Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 1987;49:50-57.
22. Prado MAM, Guatimosim C, Gomez MV, Diniz CR, Cordeiro MN, Romano-Silva MA. A novel tool for the investigation of glutamate release from rat cerebrocortical synaptosomes: the toxin Tx3-3 from the venom of the spider Phneutria nigriventer. *Biochem J* 1996;314:145-150.
23. Zarros A, Theocharis S, Skandali N, Tsakiris S. Effects of fulminant hepatic encephalopathy on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)- and Mg²⁺-ATPase: comparison of the enzymes' response to in vitro treatment with ammonia. *Metab Brain Dis* 2008; 23:255-264.
24. Fernández-Martínez A, Callejas NA, Casado M, Boscá L, Martín-Sanz P. Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *J Hepatol* 2004;40: 963-970.
25. Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Araya S, Kawada N, Yamaoka Y, Yodoi J. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology* 2003;37:1015-1025.
26. Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C. The release and neosynthesis of glutamic acid are increased in experimental models of hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1983;40:850-854.
27. McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD. Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1996;11:329-342.
28. Albrecht J, Hilgier W, Zielinska M, Januszewski S, Hesselink M, Quack G. Extracellular concentrations of taurine, glutamate, and aspartate in the cerebral cortex of rats at the asymptomatic stage of thioacetamide-induced hepatic failure: modulation by ketamine anesthesia. *Neurochem Res* 2000;25:1497-1502.
29. Minelli A, Lyons S, Nolte C, Verkhatsky A, Kettenmann H. Ammonium triggers calcium elevation in cultured mouse microglial cells by initiating Ca²⁺ release from thapsigargin-sensitive intracellular stores. *Pflugers Arch* 2000; 439:370-377.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

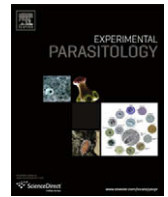
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice

Norinne Lacerda-Queiroz^{a,b}, David Henrique Rodrigues^{a,b}, Márcia Carvalho Vilela^b, Aline Silva de Miranda^b, Débora Cristina Guerra Amaral^b, Elizabeth Ribeiro da Silva Camargos^a, Leonardo José de Moura Carvalho^{c,d}, Charles L Howe^e, Mauro Martins Teixeira^b, Antônio Lúcio Teixeira^{b,f,*}

^a Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

^c Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^d La Jolla Bioengineering Institute, La Jolla, CA, USA

^e Departments of Neurology and Neuroscience, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA

^f Neurology Group, Department of Internal Medicine, School of Medicine, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2009

Received in revised form 28 January 2010

Accepted 1 February 2010

Available online 6 February 2010

Keywords:

Cerebral malaria

Leukocyte recruitment

Behavior

Cytokines

Intravital microscopy

ABSTRACT

Experimental cerebral malaria is a neuroinflammatory condition that results from the host immune response to the parasite. Using intravital microscopy, we investigated leukocyte recruitment in the brain microcirculation and the temporal relationship of this process to the behavioral changes observed in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected C57Bl/6 mice. We found that leukocyte recruitment was increased from day 5 post-infection (p.i.) onwards. Histopathological changes and increased levels of inflammatory cytokines in the brain were also observed. Behavioral performance evaluated by the SHIR-PA protocol showed functional impairment from day 6 p.i. onwards. Thus, early leukocyte migration into the brain and associated inflammatory changes may be involved in neurological impairment in parasite-infected C57Bl/6 mice.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Malaria infection causes a wide variety of clinical symptoms, ranging from mild unspecific signs to severe forms marked by deep anemia, respiratory distress syndrome and cerebral malaria (CM) (WHO, 2000). CM is the major complication of *Plasmodium falciparum* infection in humans and, in accordance to the World Health Organization (WHO) clinical criteria, is defined as a potentially reversible diffuse encephalopathy with coma in the absence of other factors that could cause reduced level of arousal (Lou et al., 2001; Medana and Turner, 2006). Long-term neurocognitive impairment has been described in children afflicted by CM (Idro et al., 2006; John et al., 2008a), but the pathogenic mechanisms underlying this impairment remain unclear.

Two main hypotheses have been proposed to explain the pathogenesis of CM: (1) neural injury following direct sequestration of parasite-infected red blood cells (pRBC) in the cerebral microvas-

culature, and (2) neural injury associated with an inflammatory response to the parasite in the central nervous system (CNS). More recently, there is a trend to consider a unified hypothesis in which parasite sequestration and inflammation cooperatively lead to microcirculatory dysfunction and to neurological symptoms (van der Heyde et al., 2006).

Many animal models have been developed to elucidate the inflammatory and/or immunological mechanisms involved in CM (de Souza and Riley, 2002). Experimental CM is characterized by an intravascular accumulation of mononuclear leukocytes and platelets and the presence of perivascular inflammation and parenchymal microhaemorrhages in the CNS (Lackner et al., 2006a). High levels of circulating and cerebral tissue cytokines have also been observed (Grau et al., 1987), including increased expression of CXCL10, CCL2, and CCL5 in mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA) (PbA) (Hanum et al., 2003). These chemokines may represent the signal responsible for the chemoattraction of circulating leukocytes into the CNS and they may also contribute directly to neuronal and glial dysfunction.

Finally, mice infected with PbA may exhibit behavioral symptoms as a result of these neuroinflammatory processes (Lackner et al., 2006b; Desruisseaux et al., 2008). In this study, in order to

* Corresponding author. Address: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, 30130-100 Av. Alfredo Balena, 190. Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2651.

E-mail address: altexr@gmail.com (A.L. Teixeira).

better understand the timing of processes involved in the behavioral changes that occur during CM, we studied early events in leukocyte migration into the CNS in PbA-infected mice using intravital microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57Bl/6 mice (6–8-week-old) were obtained from the Animal Care Facilities of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. Animals were housed in cages in temperature-controlled rooms and received food and water *ad libitum*. All procedures described had prior approval from the local animal ethics committee.

2.2. Parasite and experimental infection

P. berghei (strain ANKA) (PbA) was used in this study. Parasites were maintained in liquid nitrogen and subjected to at least one *in vivo* passage prior to use in experimental infection. Mice were infected by intraperitoneal (i.p.) injection of 10^6 pRBC suspended in 0.2 mL PBS (Grau et al., 1986). The level of parasitemia in infected mice was monitored on Giemsa-stained blood films from day 3 onwards and estimated at 1000 pRBC under immersion oil.

2.3. SHIRPA screen

The SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment (SHIRPA) screen was conceived as a multi-test behavioral battery used for longitudinal studies with standardized guidelines and materials (Rogers et al., 1997). The primary SHIRPA screen consists of a series of observations of reflexes and basic sensorimotor functions and provides a behavioral and functional profile by observational assessment of individual performance (Lalonde et al., 2005).

The SHIRPA protocol was used to evaluate behavioral changes during the course of the infection. After a period of adaptation,

the procedure was carried out on day 0 (day of infection) and then from day 3 until death on daily basis. For analysis purpose, the individual parameters assessed by SHIRPA were grouped into five functional categories (neuropsychiatric state; motor behavior; autonomic function; muscle tone and strength, and reflex and sensory function) according to Lackner et al. (2006b), determining an overall score and five domain scores. The reflex and sensory domain involves visual placing, pinna reflex, corneal reflex, toe pinch and righting reflex.

2.4. Intravital microscopy in mouse brain

Intravital microscopy of brain microvasculature was performed as previously described (Vilela et al., 2008, 2009). Briefly, control and infected mice (on day 3 and 5 p.i.) were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of Ketamine (150 mg/kg, Laboratório Cristália, Brazil) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Germany) and the tail vein was cannulated. A craniotomy was performed using a high-speed drill (Beltec, Brazil) and the dura matter was removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37 °C with a Thermo Plate (TOKAI HIT, Nikon Inc., Japan) and the exposed brain was continuously superfused with artificial cerebrospinal fluid (composition in mM: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl₂ 1.71, MgCl₂ 0.64, NaHCO₃ 24.6, dextrose 3.71 and urea 6.7, pH 7.4) kept at 37 °C.

To observe leukocyte/endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by i.v. administration of rhodamine 6G (0.3 mg/kg, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and observed using a microscope (Nikon, Eclipse 501, X10 objective lens) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). Images were captured by a camera (Nikon, DS-Qi1MC) and projected onto a monitor (LG, FLATRON-W1952TQ). Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity less than that of erythrocyte flow. Leucocytes were considered adherent to the venular endothelium (100 μm length) if they remained stationary for 30 s or longer.

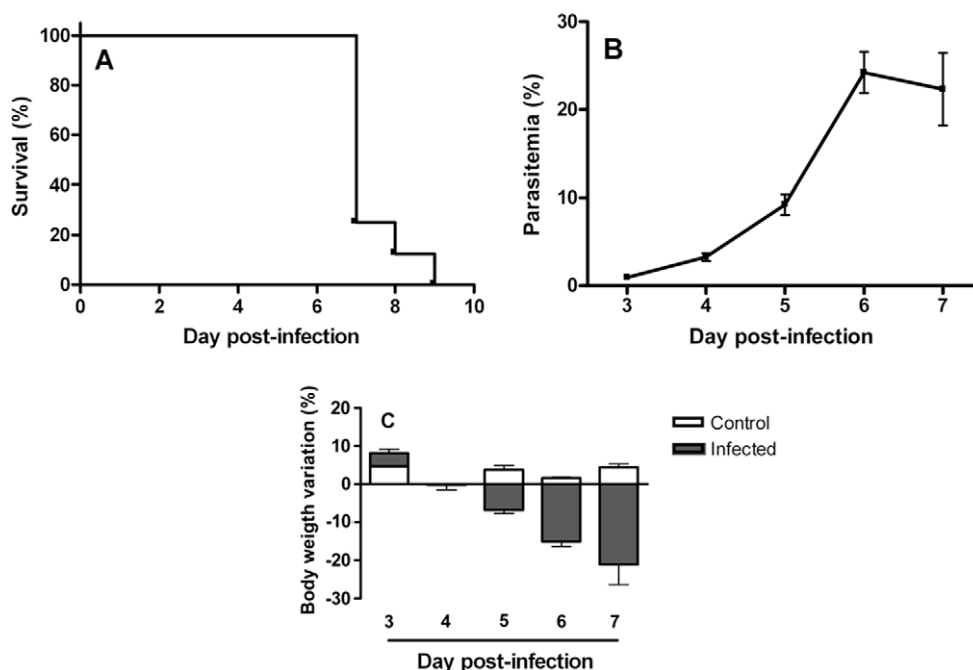


Fig. 1. (A) Time course of parasitemia in infected mice ($n = 8$). (B) Time course of survival of mice infected with PbA ($n = 8$). (C) Weight variation in control ($n = 4$) and infected ($n = 8$) mice. Each point of parasitemia and weight loss is expressed as mean \pm SEM.

2.5. Histology

For histological analysis, brains were quickly removed, fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 4 μm sections. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Slides were examined under a light microscope for qualitative analysis of inflammatory parameters.

2.6. Tissue extraction and measurement of NAG activity

The extent of macrophage sequestration was quantified indirectly by the measuring of *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase (NAG) activity in brain supernatants, as an index of monocyte influx (Barcelos et al., 2005). In brief, the brains of control and infected animals (on day 5 p.i.) were removed, weighed and the tissue was homogenized in extraction solution (100 mg of tissue per mL), containing: 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Brain homogenate was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and supernatants were collected for ELISA and stored at -20°C . The

resultant pellet was resuspended in saline/Triton 0.1%. The NAG reaction was run at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min in a 96-well microplate following the addition of 100 μL *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), dissolved in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na_2HPO_4 , pH 4.5) at a final concentration of 2.24 mM per 100 μL supernatant derived from tissue sample processing. The reaction was terminated by the addition of 100 μL 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). NAG activity was assayed by measuring the change in absorbance (optical density [OD]) at 405 nm in a spectrophotometer (Emax, Molecular Devices) and interpolated on a standard curve constructed with *p*-nitrophenol (0–500 nmol/ml) (Sigma–Aldrich). Results were expressed as change in O.D. per gram of tissue.

2.7. ELISA of proteins in cerebral tissue

Brain tissues were obtained from control and infected mice (on day 3, 5 and 7 p.i.) and the supernatant was collected and stored at -20°C . The concentrations of TNF- α , CXCL1, CXCL9, CCL2, CCL3 and CCL5 were determined by ELISA. Additionally, the systemic concentration of TNF- α and CXCL9 was measured in serum obtained from

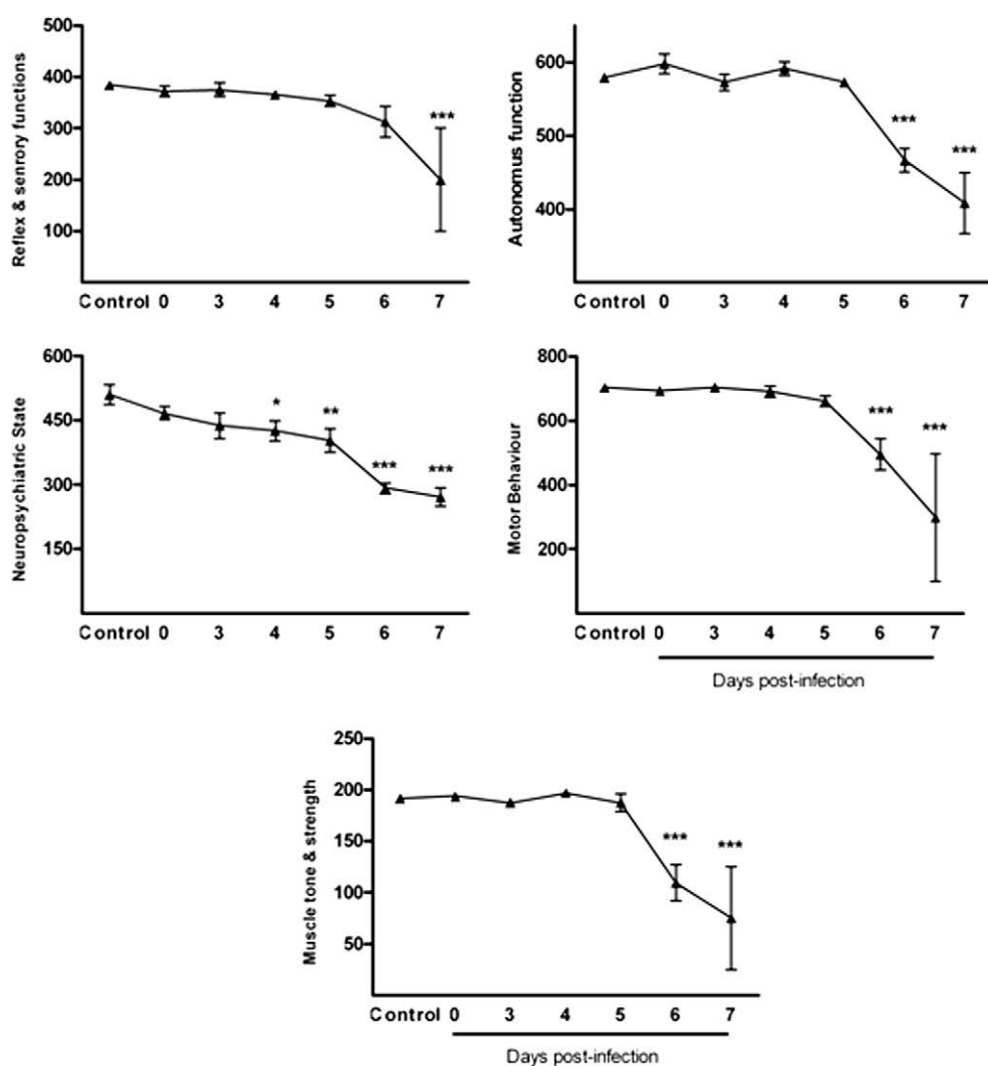


Fig. 2. Visualisation of performance of control animals and PbA-infected animals in the five distinct functional categories (neuropsychiatric state; motor behavior; autonomic function; muscle tone and strength, and reflex and sensory function). Overall scores of the functional categories are shown in groups of at least five mice. Scores of animals at different time points of infection and scores of control animals were compared by One-way ANOVA with Newman–Keuls post-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

coagulated blood (15 min at 37 °, then 30 min at 4 °C, stored at –20 °C until analysis). Samples at a 1:3 dilution in 0.1% BSA in PBS were assayed by ELISA using commercially available antibodies according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN and Pharmingen, San Diego, CA).

2.8. Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM (except the survival curve). Student *t*-test was used in NAG analyzes. SHIRPA results, leukocyte–endothelium interaction and ELISA were evaluated by ANOVA, with Newman–Keuls post-test. The survival rate was expressed as the percentage of live animals. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. *P. berghei* (strain ANKA) infection changes behavioral parameters in C57Bl/6 WT mice

C57Bl/6 WT mice were infected with PbA and monitored daily. Parasitemia progressively increased (Fig. 1A) and mortality peaked on day 7 p.i. (Fig. 1B). There was a marked weight loss in mice during the infection (Fig. 1C).

To further analyze the clinical signs of animals, we performed the SHIRPA behavioral battery. SHIRPA analysis confirmed that infected mice developed a wide range of behavioral changes during the course of the disease prior to death (Fig. 2). Neuropsychiatric state was altered in the early course of malaria infection, starting from day 4 p.i. Motor behavior, autonomic function, muscle tone

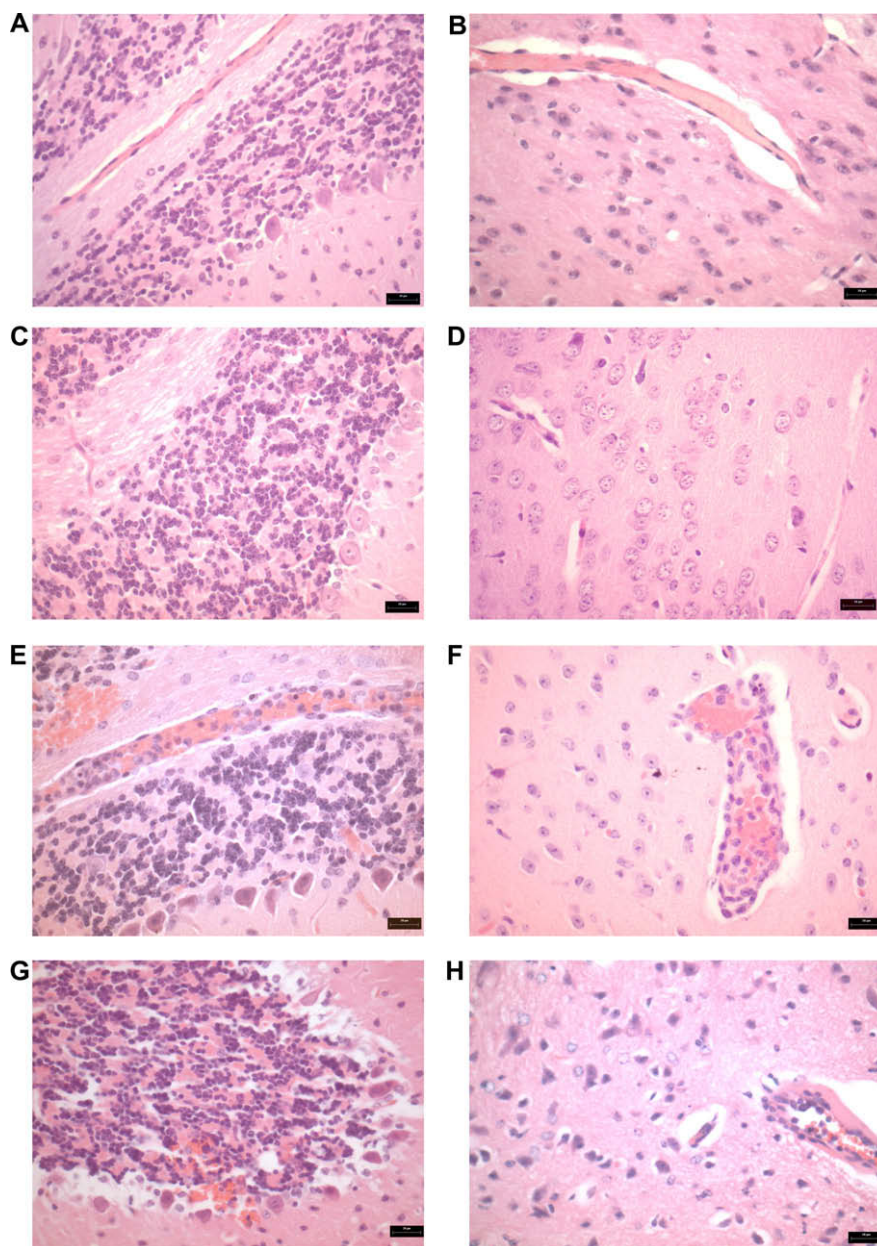


Fig. 3. Hemorrhages and intravascular inflammatory infiltrates in the brain of PbA-infected C57Bl/6 mice (H&E). (A and B) Hematoxylin and eosin-stained sections of cerebellum and cerebrum of control mice without morphological changes. (C and D) Cerebellum and cerebrum parenchyma without inflammatory cells and a typical architecture in mice on day 3 p.i. (E) Intravascular inflammatory cells and hemorrhagic areas in the cerebellum on day 5 p.i. (F) Cerebrum parenchyma with intravascular inflammatory infiltrates in the same date. (G) Multifocal hemorrhages in the cerebellum and neuronal damage on day 7 p.i. (H) Vasculat alteration with edema and intravascular inflammatory cells on day 7 p.i. Magnification, $\times 200$.

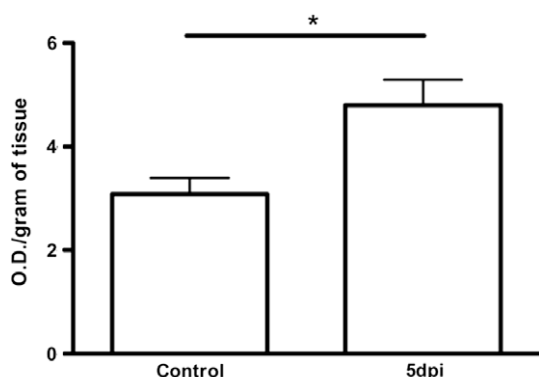


Fig. 4. NAG levels in cerebral tissue from control and infected mice. Infected mice on day 5 p.i. showed increased NAG levels when compared with control. Groups of at least five mice and results are expressed as mean ± SEM, where * $p < 0.05$.

and strength were altered from day 6, while reflex and sensory function did not change until day 7 p.i.

3.2. PbA-infected mice present several histopathological changes in the brain

Brain samples were evaluated by routine histological techniques in order to determine the progress of the morphological changes in cerebrum and cerebellum of infected mice. Control and infected mice sacrificed on day 3 p.i. had no evidence of morphological changes (Fig. 3A–D). Infected mice on day 5 p.i. showed moderate intravascular infiltrates, consisting primarily of mononuclear cells, and hemorrhagic areas, especially in the cerebellum (Fig. 3E and F). On day 7 p.i., animals exhibited endothelial damage, mild intravascular infiltrates, multifocal hemorrhages (brain parenchyma and cerebellum) and changes consistent with glial activation and neuronal damage (Fig. 3G and H).

3.3. Monocytes/macrophages are increased in the brain of PbA-infected mice

To confirm the presence of monocyte/macrophage infiltration in the brain of PbA-infected mice, we measured NAG activity in brain tissue from control and infected mice. In infected mice, on day 5 p.i., the NAG activity was almost twofold higher than that observed

in controls, indicating the presence of monocytes and macrophages (Fig. 4).

3.4. Leukocyte recruitment is increased in the pial microvasculature of PbA-infected mice

To assess the time course of the infiltration of cells into the brain, we performed intravital microscopy in the pia mater vessels. The number of rolling and adherent rhodamine-stained leukocytes was similar in control and infected animals on day 3 p.i., but increased significantly on day 5 p.i. ($p < 0.001$) (Fig. 5), consistent with the heightened monocyte/macrophage accumulation observed by histology and NAG measurements.

3.5. CC and CXC chemokines are increased in the brain of PbA-infected mice

Leukocyte activation and recruitment depends on the involvement of cytokines and chemokines. Therefore, we evaluated cerebral levels of TNF- α and the chemokines CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 and CXCL9 (Fig. 6). PbA infection increased cerebral levels of CXCL9 on days 5 and 7 p.i., and CCL2, CCL3 and CCL5 on day 7 p.i., but did not alter CXCL1 levels. Serum levels of TNF- α were increased on days 5 and 7 p.i., and serum CXCL9 levels were increased on days 3, 5 and 7 p.i.

4. Discussion

In this study, we found a temporal association between behavioral changes and inflammatory parameters in the CNS of PbA-infected mice. The early leukocyte recruitment events observed on day 5 p.i. preceded neurological changes, which were clearly evident from day 6 p.i. until death.

PbA induces a neurological syndrome in susceptible mouse strains that resembles human CM. The concept of experimental CM is traditionally associated with the presence of typical neurological signs, such as ataxia, paralysis, seizures and coma, followed by death (Bagot et al., 2002). However, as the pathogenesis of CM includes different mechanisms with a varying degree of severity, this concept may be too restrictive, not encompassing more subtle neurological signs, including mild to moderate cognitive impairment (Medana et al., 2001). Along this line, Desruisseaux et al. (2008) recently demonstrated that memory dysfunction in experimental malaria correlated with brain inflammation and hemor-

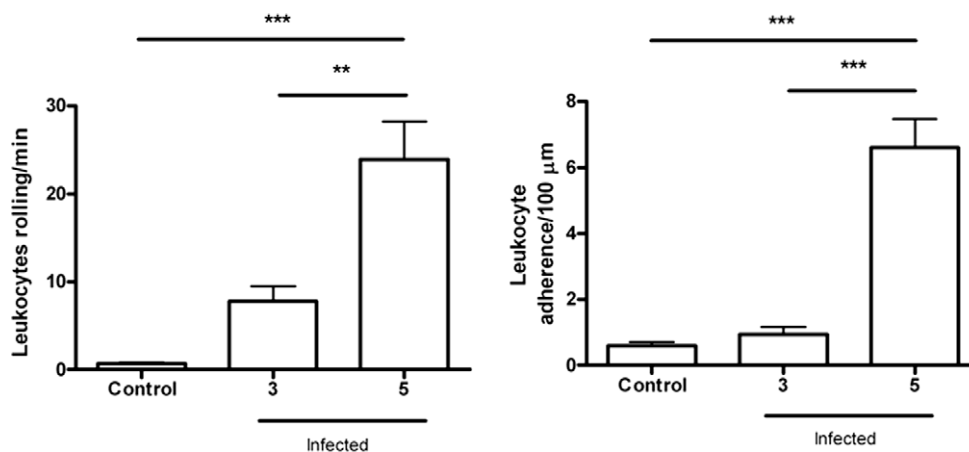


Fig. 5. The study of leukocyte–endothelium interaction was performed by intravital microscopy. The rolling and adhesion of leukocytes in the brain microvasculature were assessed. The protocol included control (sham) and infected animals. Mice, infected by PbA, on day 5 p.i. showed an increase in cell recruitment when compared with control. Groups of at least five mice, results are expressed as mean ± SEM, where ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. ANOVA confirmed the significance.

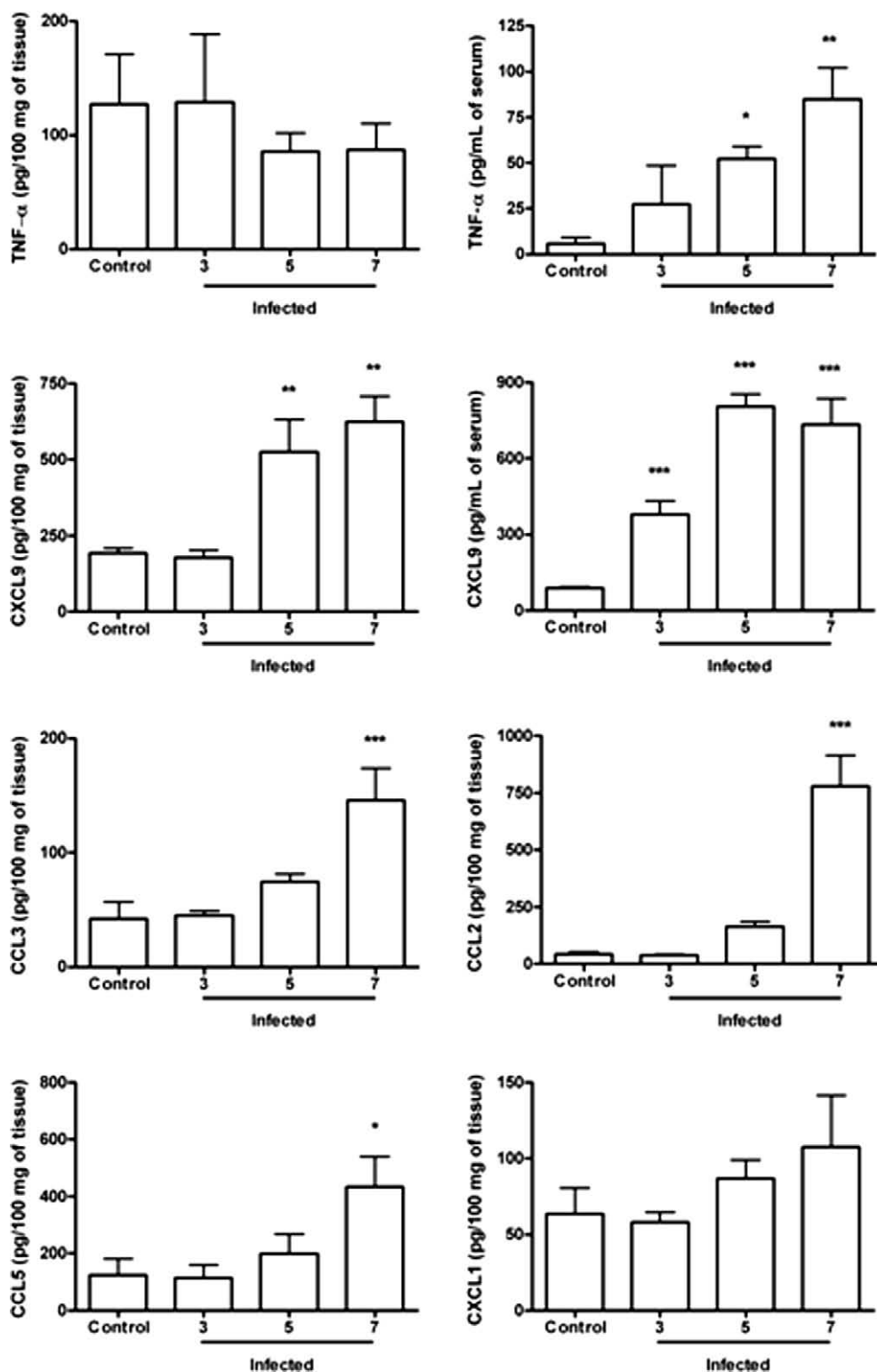


Fig. 6. Comparative analysis of TNF- α , CCL2, CXCL1, CXCL9, CCL5 and CCL3 concentration in control and PbA-infected mice by ELISA. Results were expressed as the mean \pm SEM from at least five animals per group. Asterisk(s) indicate statistical differences where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

rhage, as well as microglial activation. Our results corroborate these findings, as a series of neurological signs developed in association with early inflammatory changes in CNS. We found an increase in the rolling and adhesion of leukocytes by *in vivo* analysis of cell recruitment using intravital microscopy. This increase was observed on day 5 p.i., while most neurological changes were observed after 6 days of infection.

Once we observed these inflammatory changes, we looked at the brain tissue. The major histopathologic findings were hemorrhagic areas and intravascular inflammatory infiltrates composed mainly of mononuclear cells. The increase of NAG in brain supernatants corroborated the histopathologic finding of mononuclear recruitment to brain tissue in infected animals (Martins et al., 2009). NAG activity is one of the many parameters that can assess

macrophage activity and, hence, is an index of monocyte/macrophage tissue infiltration (Reiner et al., 1981). One limitation of our work is the absence of a more detailed study of the types of leukocytes recruited into CNS. This is an interesting issue as previous studies emphasized the role of determined cell types, such as CD8⁺ T, in the development of neurological signs in the course of CM (Belnoue et al., 2002). Future studies will address in detail the leukocyte subtypes infiltrating the brain and their putative role in modifying behavioural function.

There was also an increase in the levels of chemokines in the brain. Previous studies showed that chemokines up-regulate the expression of adhesion molecules and facilitate leukocyte migration processes in the brain (Ransohoff, 2002). The specific role of chemokines in determining the clinical severity and/or the outcome of malaria or CM remains to be defined. However, as demonstrated by others (Hanum et al., 2003; Miu et al., 2008; Van den Steen et al., 2008), we found increased cerebral levels of chemokines in the brain of mice infected with PbA. Specifically, we found that CXCL9, an interferon- γ -inducible chemokine (Farber, 1997), was upregulated at day 5 p.i. in the brain and at day 3 p.i. in the serum (Fig. 6), predicting the large increase in infiltrating leukocytes in the brain microvasculature (Figs. 3 and 5) and the onset of functional deficits (Fig. 2). This CXCR3 ligand is associated with macrophage activation (Menke et al., 2008) and leukocyte infiltration in a number of inflammatory disease states associated with parasite infection, including Chagas disease (Cutrullis et al., 2009). Whether CXCL9 in our model was produced by neural cells or by an early wave of infiltrating macrophages and whether the brain CXCL9 promoted additional macrophage recruitment and/or T cell recruitment remains to be determined.

Recently, Miu et al. (2008) showed the up-regulation of CXCL9 and CCL5 in experimental CM at the level of mRNA expression. These two chemokines are directly involved in T cell and monocyte/macrophage recruitment to target tissues (Simpson et al., 2000). Additionally, CXCL9^{-/-} mice (Campanella et al., 2008) and IP-10^{-/-} mice (Nie et al., 2009) were reported to be partially/markedly resistant to CM during PbA infection, and exhibited lower leukocyte migration to the brain. Therefore, the increase in leukocyte recruitment during PbA infection in wild type mice in our model may be a direct consequence of CXCL9 upregulation.

Finally, systemic inflammation, as suggested by the increase of serum CXCL9 levels on day 3 p.i., could explain the early alteration in neuropsychiatric state starting at day 4 p.i. However, whether chemokine expression directly results in cognitive dysfunction or whether recruited leukocytes are primarily responsible remains unclear. The association of inflammatory chemokine and cytokine production in the CNS with mild cognitive impairment (John et al., 2008b) and under conditions of CNS viral infection (Sui et al., 2007) suggests that these factors may directly impair neuronal function.

In the present study, we found that deficits in cognitive function associated with cerebral malaria in mice triggered by infection with *P. berghei* (strain ANKA) follows an early wave of leukocyte recruitment to the CNS. This recruitment may be driven predominantly by CXCL9, as this was the chemokine that we observed to be increased in the brain prior to severe cognitive impairment. The upregulation of CCL2, CCL3, and CCL5 in the brain at later time-points just prior to death suggests that these chemokines are not responsible for the initial inflammatory infiltration into the malarial CNS. Further studies are necessary to define leukocyte subsets recruited into the CNS and possibly involved in behavioral changes.

Acknowledgments

The authors thank Carlos Henrique da Silva and Catherine Kelly Martins for their technical assistance. This work was financially

supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (Rede IBN-Net), Brazil. LJMC is recipient of NIH Grants R01-HL087290 (NHLBI) and R01-AI082610 (NIAID).

References

- Bagot, S., Idrissa Boubou, M., Campino, S., Behrschmidt, C., Gorgette, O., Guenet, J.L., Penha-Goncalves, C., Mazier, D., Pied, S., Cazenave, P.A., 2002. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infection and Immunity* 70, 2049–2056.
- Barcelos, L.S., Talvani, A., Teixeira, A.S., Vieira, L.Q., Cassali, G.D., Andrade, S.P., Teixeira, M.M., 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology* 78, 352–358.
- Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigario, A.M., Deschemin, J.C., van Rooijen, N., Viguier, M., Snounou, G., Rénia, L., 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alpha-beta CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology* 169, 6369–6375.
- Campanella, G.S., Tager, A.M., El Khoury, J.K., Thomas, S.Y., Abraszinski, T.A., Manice, L.A., Colvin, R.A., Luster, A.D., 2008. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4814–4819.
- Cutrullis, R.A., Postan, M., Petray, P.B., Corral, R.S., 2009. Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathobiology* 76, 170–180.
- Desruisseaux, M.S., Gulino, M., Smith, D.N., Lee, S.C., Tsuji, M., Weiss, L.M., Spray, D.C., Tanowitz, H.B., 2008. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *The Journal of Infectious Diseases* 197, 1621–1627.
- de Souza, J.B., Riley, E.M., 2002. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection* 4, 291–300.
- Farber, J.M., 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 61, 246–257.
- Grau, G.E., Pigué, P.F., Engers, H.D., Louis, J.A., Vassali, P., Lambert, P.H., 1986. L3T4⁺ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Journal of Immunology* 137, 2348–2354.
- Grau, G.E., Fajardo, L.F., Pigué, P.F., Allet, B., Lambert, P.H., Vassalli, P., 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237, 1210–1212.
- Idro, R., Carter, J.A., Fegan, G., Neville, B.G., Newton, C.R., 2006. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Archives of Disease in Childhood* 91, 142–148.
- Hanum, P.S., Hayano, M., Kojima, S., 2003. Cytokine and chemokine responses in a cerebral malaria-susceptible or -resistant strain of mice to *Plasmodium berghei* ANKA infection: early chemokine expression in the brain. *International Immunology* 15, 633–640.
- John, C.C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R.O., Idro, R., Jurek, A.M., Wu, B., Boivin, M.J., 2008a. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 122, 92–99.
- John, C.C., Panoskaltis-Mortari, A., Opoka, R.O., Park, G.S., Orchard, P.J., Jurek, A.M., Idro, R., Byarugaba, J., Boivin, M.J., 2008b. Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 198–205.
- Lackner, P., Beer, R., Helbok, R., Broessner, G., Engelhardt, K., Brenneis, C., Schmutzhard, E., Pfaller, K., 2006a. Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malaria Journal* 5, 116.
- Lackner, P., Beer, R., Heussler, V., Goebel, G., Rudzki, D., Helbok, R., Tannich, E., Schmutzhard, E., 2006b. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32, 177–188.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufienbiel, M., Strazielle, C., 2005. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavioural Brain Research* 157, 91–98.
- Lou, J., Lucas, R., Grau, G.E., 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 810–820.
- Martins, Y.C., Smith, M.J., Pelajo-Machado, M., Werneck, G.L., Lenzi, H.L., Daniel-Ribeiro, C.T., Carvalho, L.J., 2009. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *International Journal of Experimental Pathology* 90, 119–130.
- Medana, I.M., Chaudhri, G., Chan-Ling, T., Hunt, N.H., 2001. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunology and Cell Biology* 79, 101–120.
- Medana, I.M., Turner, G.D., 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *International Journal for Parasitology* 36, 555–568.
- Menke, J., Zeller, G.C., Kikawada, E., Means, T.K., Huang, X.R., Lan, H.Y., Lu, B., Farber, J., Luster, A.D., Kelley, V.R., 2008. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 19, 1177–1189.
- Miu, J., Mitchell, A.J., Müller, M., Carter, S.L., Manders, P.M., McQuillan, J.A., Saunders, B.M., Ball, H.J., Lu, B., Campbell, I.L., Hunt, N.H., 2008. Chemokine gene

- expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *Journal of Immunology* 180, 1217–1230.
- Nie, C.Q., Bernard, N.J., Norman, M.U., Amante, F.H., Lundie, R.J., Crabb, B.S., Heath, W.R., Engwerda, C.R., Hickey, M.J., Schofield, L., Hansen, D.S., 2009. IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000369.
- Ransohoff, R.M., 2002. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *The Journal of Infectious Diseases* 186, 152–156.
- Reiner, R.G., Tanner, A.R., Keyhani, A.H., Wright, R., 1981. A comparative study of lysosomal enzyme activity in monocytes and Kupffer cells isolated simultaneously in a rat model of liver injury. *Clinical and Experimental Immunology* 43, 376–380.
- Rogers, D.C., Fisher, E.M., Brown, S.D., Peters, J., Hunter, A.J., Martin, J.E., 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome* 8, 711–713.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Woodroffe, M.N., 2000. Expression of the interferon- γ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 26, 133–142.
- Sui, Z., Sniderhan, L.F., Schifitto, G., Phipps, R.P., Gelbard, H.A., Dewhurst, S., Maggirwar, S.B., 2007. Functional synergy between CD40 ligand and HIV-1 Tat contributes to inflammation: implications in HIV type 1 dementia. *Journal of Immunology* 178, 3226–3236.
- Van den Steen, P.E., Deroost, K., Van Aelst, I., Geurts, N., Martens, E., Struyf, S., Nie, C.Q., Hansen, D.S., Matthys, P., Van Damme, J., Opendakker, G., 2008. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN- γ -induced chemokines. *European Journal of Immunology* 38, 1082–1095.
- van der Heyde, H.C., Nolan, J., Combes, V., Gramaglia, I., Grau, G.E., 2006. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology* 22, 503–508.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Arantes, R.M., Kroon, E.G., Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2008. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neuroscience Letters* 445, 18–22.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Lima, G.K., Arantes, R.M., Kroon, E.G., da Silva Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2009. The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe herpes simplex encephalitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153, 256–263.
- WHO, 2000. Severe falciparum malaria: World Health Organization, communicable diseases cluster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, S1–S90.



TNFR1 plays a critical role in the control of severe HSV-1 encephalitis

Márcia Carvalho Vilela^a, Graciela Kunrath Lima^b, David Henrique Rodrigues^c,
Norinne Lacerda-Queiroz^c, Daniel Santos Mansur^c, Aline Silva de Miranda^a, Milene Alvarenga Rachid^d,
Erna Geessien Kroon^b, Leda Quercia Vieira^c, Marco Antônio Campos^e, Mauro Martins Teixeira^c,
Antônio Lúcio Teixeira^{a,*}

^a Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina (FM), Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Brazil

^d Departamento de Patologia Geral, ICB, Brazil

^e Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2010

Received in revised form 6 May 2010

Accepted 8 May 2010

Keywords:

Herpes simplex virus type 1

TNFR1

Neuroinflammation

ABSTRACT

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) is a pathogen for humans that may cause severe encephalitis. Tumor necrosis factor α (TNF- α) plays a role in several viral diseases of the central nervous system (CNS). The classic proinflammatory activities of TNF- α are mediated mainly through activation of the receptor 1 for TNF- α (TNFR1). However, when HSV-1 is inoculated in the periphery, TNF- α seems to protect C57Bl/6 mice against encephalitis by a mechanism independent of TNFR1. This study aims to investigate the role of TNFR1 in HSV-1 encephalitis induced by the inoculation of the virus into the brain. Wild-type C57Bl/6 (WT) and TNFR1^{-/-} were inoculated with 10² plaque-forming units of HSV-1 by the intracranial route. Infection with HSV-1 was lethal in TNFR1^{-/-} mice in early times after infection. TNFR1^{-/-} mice had reduced expression of the chemokines CCL3 and CCL5, and decreased leukocyte adhesion in the brain vasculature compared to WT mice 4 days post-infection (dpi). At this time point TNFR1^{-/-} infected mice also had higher HSV-1 viral replication and more injuries in the brain, especially in the hippocampus. In conclusion, TNFR1 seems to play a relevant role in the control of viral replication in the CNS when HSV-1 is inoculated by intracranial route.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a neurotropic double-stranded DNA virus that belongs to the *Herpesviridae* family. The encephalitis caused by these viruses is the commonest fatal sporadic encephalitis in humans [9].

TNF- α seems to play a role in several viral diseases of the central nervous system (CNS), including HSV-1 infection. Following peripheral infection of mice, HSV-1 replicates in epithelial cells and disseminates via sensory axons for the corresponding ganglia. Depending on the immune response in these sites, HSV-1 can achieve the CNS leading to mild to fatal encephalitis.

Besides a possible direct inhibition of the virus, TNF- α seems to be important for cell activation and control of HSV-1 infection. For instance, the production of TNF- α seems to contribute to neutrophil-mediated clearance of HSV-1 in epithelial tissues [24].

* Corresponding authors at: Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UFMG, Av. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte 30130-100, Brazil. Tel.: +55 31 34092651; fax: +55 31 34092651.

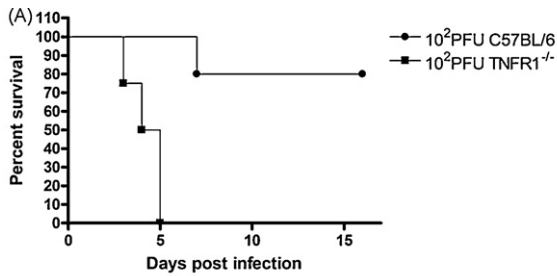
E-mail addresses: marciavilela@gmail.com (M.C. Vilela), altextr@gmail.com (A.L. Teixeira).

Macrophages rather than neutrophils dominate the inflammatory infiltrate in the ganglion and participate in the control of HSV-1 replication and spreading. The activation of TNF- α receptor 1 (TNFR1 or p55) determines gene activation that induces inflammatory and cytotoxic response [23].

Recent studies demonstrated that TNF- α protects C57Bl/6 mice against HSV-1 encephalitis independently of signaling via TNFR1 when the virus was inoculated in the periphery, i.e. by corneal scarification [16]. In the present study, we aimed to explore the biological role of TNFR1 in the CNS on the control of HSV-1 infection. To study the immune response elicited in the CNS compartment, it was necessary to inoculate the virus directly in the brain [27].

All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). Male C57Bl/6 mice, aged 7–9 weeks, were obtained from Animal Care Facilities of the Institute of Biological Sciences, UFMG. TNFR1^{-/-} mice in C57Bl/6 background were obtained from the Gnotobiology Laboratory, ICB, UFMG.

Anesthetized mice were inoculated intracranially with 10² plaque-forming units (PFU) of neurotropic HSV-1, strain EK [21] virus in the right side of the saggital suture at the level of the



(B) TCID₅₀ titration in the brain of mice

Mouse Group	Mean Brain TCID ₅₀ /mL
WT	10 ²
TNFR1 ^{-/-}	10 ^{4.9} *

* $p < 0.001$ C57BL/6 group compared to TNFR1^{-/-} group (*t* Student).

Fig. 1. TNFR1^{-/-} mice are susceptible to infection with HSV-1. (A) C57BL/6 ($n = 18$) (square) and TNFR1^{-/-} mice were intracerebrally inoculated with 10² PFU of HSV-1 and survival was assessed daily. (B) TCID₅₀ titration in the brain of mice.

eyes. Propagation and titration of virus were done as previously described [3,12,21].

Intravital microscopy of the mouse brain microvasculature was performed at 4 days post-infection (p.i.) [5,10]. Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection and a craniotomy was performed using a high-speed drill and the dura mater was removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37 °C with a heating pad and the exposed brain was continuously superfused with artificial cerebrospinal fluid buffer. The tail vein was cannulated for administration of fluorescent dyes. Leukocytes were fluorescently labeled by intravenous administration of Rhodamine 6G-Sigma (0.5 mg/kg body weight) and were observed using a microscope (Olympus B201, 10× objective lens, corresponding to 100 μm of area) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). The number of rolling and adherent leukocytes was determined offline during video playback analyses. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for a minimum of 30 s. Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a speed lower than that of erythrocytes within a given vessel.

After intravital microscopy, the animals were sacrificed and their brains were removed. One fragment of the brain was homogenized in extraction solution containing aprotinin. The concentration of the chemokines CCL3 and CCL5, and the cytokines TNF-α and IFN-γ was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). For histological analysis, another fragment of the brain was preserved in 10% buffered formalin. Sections 5 μm thick were cut and mounted for routine haematoxylin and eosin staining. These sections were examined at the optical level in the Olympus Microscopy. Digital images were acquired for documentation. One brain fragment from each animal was weighed, homogenized for virus titration and the values expressed by TCID₅₀/mL.

Data are shown as mean ± SEM A one-way ANOVA with Tukey's correction was used for multiple comparisons. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Wild-type (WT) mice infected with 10² PFU of HSV-1 started dying at day 7 p.i., but 80% of these mice survived. Infected TNFR1^{-/-} mice started dying at day 3 p.i. and 100% of these mice were dead at day 5 p.i. There was a significant difference in survival rates between these groups ($p < 0.001$) (Fig. 1A). All infected animals that died had developed clinical signs of encephalitis, such as hunched posture, ataxia and weight loss. Seizures were observed in the terminal stage of the disease.

TNFR1^{-/-} mice showed a significant increase (10^{4.9} TCID₅₀/mL, $p < 0.001$) in virus titers when compared to WT (10² TCID₅₀/mL) infected mice at day 4 p.i. (Fig. 1B). The higher viral load suggested that TNFR1^{-/-} mice presented a deficient control of viral replication.

Infected WT mice presented increased levels of CCL3 and CCL5 at day 4 p.i. as compared to non-infected WT mice. Infected TNFR1^{-/-} mice showed a significant decrease in the production of these chemokines when compared to infected WT animals (Fig. 2). There was no significant difference in the production of the cytokines IFN-γ and TNF-α among the groups.

To analyze whether the lower chemokine production influenced the recruitment of immune cells into the CNS in TNFR1^{-/-} mice, we evaluated the rolling and adhesion steps of this process. The exposed murine pial vasculature of control WT mice revealed a small number of leukocytes rolling and adhering. At day 4 p.i. the number of rolling (Fig. 3A) and adhering (Fig. 3B) leukocytes in the endothelium increased significantly in infected animals (see images in Fig. 3C). When comparing WT and TNFR1^{-/-} mice, the latter presented a significant decrease in leukocyte adhesion in the microvasculature.

No lesions were detected in the brain of animals from the non-infected group. The HSV-1 infected animals developed focal meningitis, consisted mainly of neutrophils, lymphocytes and macrophages. The cerebral cortex exhibited multifocal microgliosis. Inclusion bodies were presented within neurons, mainly in the subcortical region. Perivascular cuffing, consisting primarily of mononuclear cells, was detected in the cerebrum, brainstem and hippocampus. Occasional shrinkage neurons were visualized at CA areas of the hippocampus. The cerebellum was rarely affected. By contrast, TNFR1^{-/-} animals displayed increased severity of neuronal lesions in cerebrum, brainstem and hippocampus, and less inflammatory infiltrates which is in line with the intravital microscopy studies. Changes were more prominent in the dentate gyrus and CA3 region and were characterized by extensive loss of pyramidal neurons and reactive gliosis (Fig. 4).

The present work showed that mice lacking the receptor 1 for TNF-α are more susceptible to HSV-1 infection. TNFR1^{-/-} mice presented deficient immune responses in the CNS, as evidenced by lower chemokine expression and leukocyte recruitment, leading to a more severe neuronal pathology. The deficiency in immune parameters such as antigen presenting function and T cell stimulatory capacity of Schwann cells has already been described in TNFR1^{-/-} mice with experimental autoimmune neuritis [17]. The mechanisms underlying the resistance to HSV-1 in the CNS of C57BL/6 mice remain to be determined.

It has been already established that the absence of TNF-α leads to a more severe disease after HSV-1 infection [16,20]. Also, Lundberg et al. demonstrated that TNF-α antiviral effects are independent of TNFR1 in mice infected with HSV-1 by corneal scarification [16]. However, our results show a significant decrease in the survival of TNFR1^{-/-} infected by intracranial route. When the virus was inoculated in the periphery in C57BL/6 mice, immune response of the host efficiently controlled virus infection even without TNFR1 [16]. Various routes of infection have been used to establish HSV encephalitis in mice, including intranasal [8], intracerebral and intraperitoneal [13,14] and intracutaneous [7]. Among all these, the intracerebral route is a way to elicit an immune response directly from the CNS, aiming to exclude immune activation in the periphery. Therefore, TNFR1 seems to be relevant for the control of HSV-1 replication in CNS when there is no activation of the immune system in the periphery.

In our study, neuronal lesions in cerebrum, brainstem and hippocampus from TNFR1^{-/-} mice were confirmed by histopathological studies. The HSV-1 titers in the brain of TNFR1^{-/-} mice were elevated, suggesting that neuronal lesion and high mortality

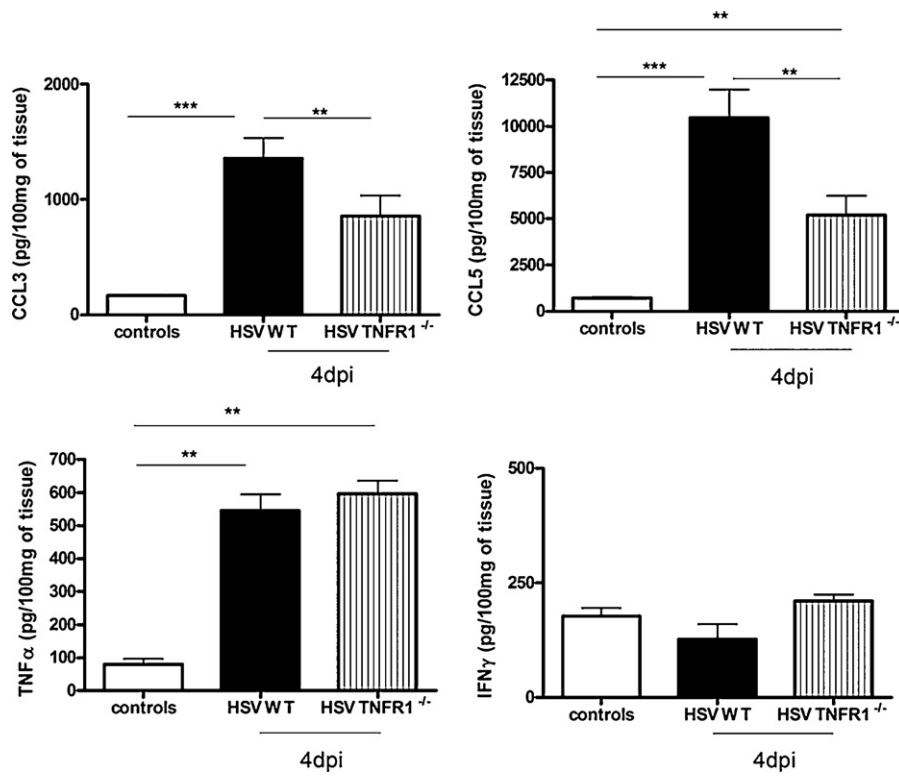


Fig. 2. Chemokine and cytokine levels in the CNS after intracerebral inoculation with 10^2 PFU of HSV-1 in C57BL/6 ($n=9$) and TNFR1^{-/-} ($n=8$) mice. Protein concentrations were measured in brain extracts by ELISA. Assay was performed in cells of C57BL/6 and TNFR1^{-/-} mice for CCL3 and CCL5 at day 4 p.i. Data indicate mean \pm SEM. Statistically significant results (indicated as *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$) of C57BL/6 and TNFR1^{-/-} infected mice as compared to control mice. Chemokine production values were significantly decreased in TNFR1^{-/-} when compared to C57BL/6 inoculated mice. Statistical analysis used: one-way ANOVA with Tukey's correction.

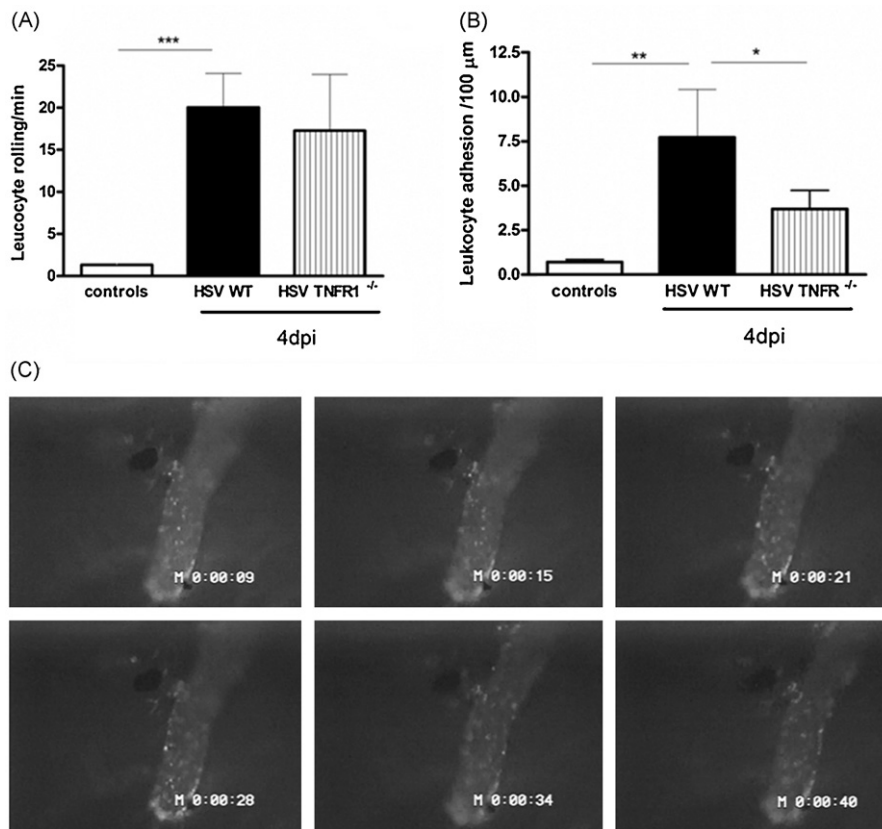


Fig. 3. Visualization of leukocyte–endothelium interaction at day 4 p.i. with HSV-1. C57BL/6 ($n=8$) and TNFR1^{-/-} ($n=5$) were intracerebrally inoculated with 10^2 PFU of HSV-1. Intravital microscopy was used to assess (A) adhesion and (B) rolling of leukocytes on the brain microvasculature. Data indicate mean \pm SEM of (A) cells per 100 μ m and (B) minutes. Adhered leukocyte counting in TNFR1^{-/-} infected mice was decreased statistically (* $p < 0.05$) when compared to C57BL/6 infected mice. (C) Timelapse images from intravital microscopy showing adhered and rolling cells. Statistical analysis used: one-way ANOVA with Tukey's correction.

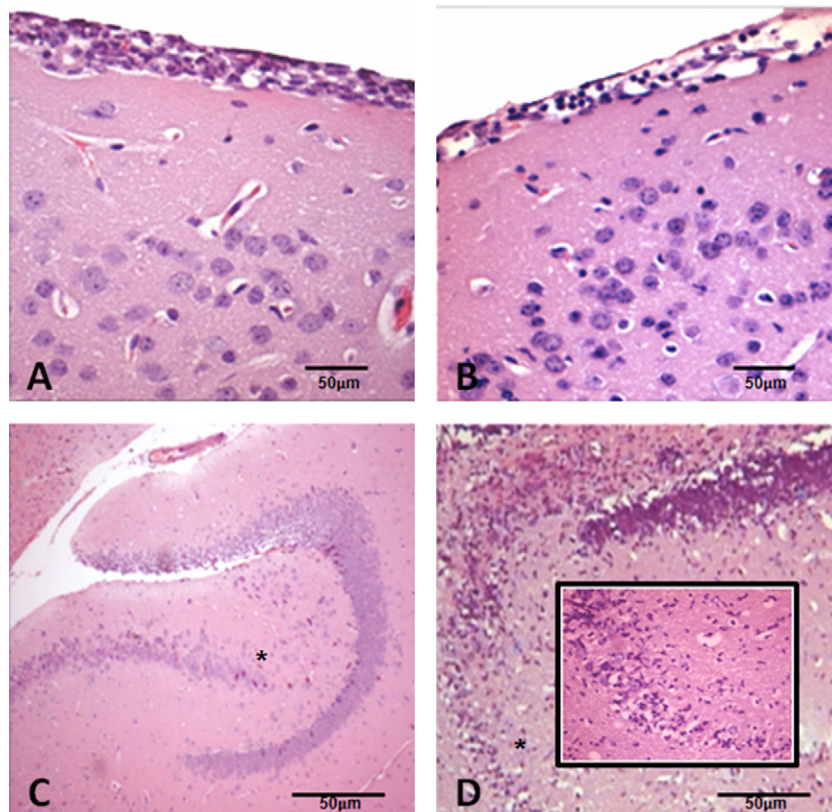


Fig. 4. Histological changes in the brain after intracerebral inoculation with 10^2 PFU of HSV-1 in WT and TNFR1^{-/-} mice. H&E-stained sections of the brain. (A) Cells infiltrating the meninges of WT at day 4 p.i. Meningitis score: 4. (B) Cells infiltrating the meninges of TNFR1^{-/-} at day 4 p.i. Meningitis score: 2. (C) Preserved CA areas and dentate gyrus of hippocampus, WT at day 4 p.i. Observe occasional shrinkage neurons (asterisk). (D) Hippocampus: note the intense neuronal destruction of pyramidal layer from CA3 area (asterisk and insert), TNFR1^{-/-} at day 4 p.i.

would be related to the viral multiplication in the brain as suggested by some authors [20]. Previous studies showed that infiltration of immune cells into the brain during HSV-1 infection causes as much damage as the virus itself [6]. Considering that much less infiltration of immune cells was seen in the brain of TNFR1^{-/-} mice, this hypothesis seems unlikely.

The decreased inflammatory response in TNFR1^{-/-} mice is in line with the diminished expression of CCL3 and CCL5 in the brain, and decreased leukocyte adhesion in meningeal vessels of these mice. Thus, the increase in viral replication may be a consequence of the disruption of the immune response to the pathogen in TNFR1^{-/-} mice. The condition of lower chemokine synthesis with lower expression of adhesion molecules and lower infiltration of immune cells may be impairing the capacity of the immune system to clear the virus. Control of HSV-1 infection requires the recruitment of natural killer cells which are attracted to the inflammatory site by CCL3 and CCL5 chemokines [4,26]. CCL5 is also involved with T cells recruitment to the CNS [1,25]. We have previously shown that CCL5 plays a relevant role in the recruitment of leukocytes into the brain of HSV-1 infected mice [28].

Another possibility to explain decreased levels of chemokines could be related to the effect of TNF- α on microglia. Marques et al. described an early macrophage and neutrophil infiltration into the brain followed by prolonged microglial activation and T lymphocyte retention after intranasal HSV-1 infection [19]. These cells are considered relevant sources of proinflammatory cytokines and chemokines in response to HSV-1 [15,18].

Our data provide strong evidence of the involvement of TNF- α in the pathogenesis of HSV-1 encephalitis. This is in line with recent reports of the development of HSV-1 encephalitis in humans using TNF- α inhibitor [2]. Preliminary studies have reported that corila-

gin, a member of the tannin family has TNF- α inhibition [22] and anti-inflammatory properties [11]. This agent promoted inhibition of HSV-stimulated microglia by interference in the release of TNF- α , IL-1 β and NO.

In summary, using an intracranial inoculation, we demonstrated here that lack of receptor 1 for TNF- α aggravates the HSV-1 brain lesions when the virus is inoculated by intracranial route. The inflammatory process in TNFR1^{-/-} mice is not able to control viral replication, resulting in increased neuronal damage. Future studies are warranted to investigate the mechanisms by which TNFR1 activates an efficient immune response in the CNS.

Acknowledgments

This work was supported by Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (Rede IBN Net), Capes and CNPq, Brazil. We thank Antonio Mesquita Vaz for excellent animal care.

References

- [1] K.E. Balashov, J.B. Rottman, H.L. Weiner, W.W. Hancock, CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6873–6878.
- [2] R.D. Bradford, A.C. Pettit, P.W. Wright, M.J. Mulligan, L.W. Moreland, D.A. McLain, J.W. Gnann, K.C. Bloch, Herpes simplex encephalitis during treatment with tumor necrosis factor- α inhibitors, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 924–927.
- [3] M.A. Campos, E.G. Kroon, Critical period of irreversible block of vaccinia virus replication, *Rev. Microbiol.* 24 (1993) 104–110.
- [4] D. Carr, J. Ash, T. Lane, W. Kuziel, Abnormal immune response of CCR5-deficient mice to ocular infection with herpes simplex virus type 1, *J. Gen. Virol.* 87 (2006) 489–499.

- [5] J. Carvalho-Tavares, M.J. Hickey, J. Hutchison, J. Michaud, I.T. Sutcliffe, P. Kubes, A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature, *Circ. Res.* 8 (2000) 1141–1148.
- [6] W.L. Chan, T. Javanovic, M.L. Lukic, Infiltration of immune T cells in the brain of mice with herpes simplex virus-induced encephalitis, *J. Neuroimmunol.* 23 (1989) 195–201.
- [7] E. DeClercq, A. Holý, Efficacy of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)-cytosine in various models of herpes simplex virus infection in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 (1991) 701–706.
- [8] E. DeClercq, M. Luczak, Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for evaluation of the efficacy of experimental drugs, *J. Infect. Dis.* 133 (1976), 226–A236.
- [9] R.B. Domingues, A.L. Teixeira, Migrânea e inflamação, *Migrânea e Cefaléias* 12 (2009) 126–130.
- [10] A.C. dos Santos, M.M. Barsante, R.M. Arantes, C.C. Bernard, M.M. Teixeira, J. Carvalho-Tavares, CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study, *J. Neuroimmunol.* 162 (2005) 122–129.
- [11] Y.J. Guo, L. Zhao, X.F. Li, Y.W. Mei, S.L. Zhang, J.Y. Tao, Y. Zhou, J.H. Dong, Effect of Corilagin on anti-inflammation in HSV-1 encephalitis and HSV-1 infected microglia, *Eur. J. Pharmacol.* 635 (2010) 79–86.
- [12] W.K. Joklik, The purification of four strains of poxvirus, *Virology* 18 (1962) 9–18.
- [13] E.R. Kern, L.A. Glasgow, J.C. Overall Jr., J.M. Reno, J.A. Boezi, Treatment of experimental herpesvirus infections with phosphonoformate and some comparisons with phosphonoacetate, *Antimicrob. Agents Chemother.* 14 (1978) 817–823.
- [14] E.R. Kern, J.T. Richards, J.C. Overall Jr., L.A. Glasgow, Alteration of mortality and pathogenesis of three experimental herpesvirus hominis infections of mice with adenine arabinoside 5'-monophosphate, adenine arabinoside, and phosphonoacetic acid, *Antimicrob. Agents Chemother.* 13 (1978) 53–60.
- [15] J.R. Lokensgard, S. Hu, W. Sheng, M. vanOijen, D. Cox, M.C. Cheeran, P.K. Peterson, Robust expression of TNF- α , IL-1 β , RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus, *J. Neurovirol.* 7 (2001) 208–219.
- [16] P. Lundberg, P.V. Welander, C.K. Edwards III, N. van Rooijen, E. Cantin, Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2, *J. Virol.* 81 (2007) 1451–2146.
- [17] X.J. Mao, X.M. Zhang, H.L. Zhang, H.C. Quezada, E. Mix, X. Yang, B. Winblad, A. Adem, J. Zhu, TNF- α receptor 1 deficiency reduces antigen-presenting capacity of Schwann cells and ameliorates experimental autoimmune neuritis in mice, *Neurosci. Lett.* 470 (2010) 19–23.
- [18] C.P. Marques, M.C. Cheeran, J.M. Palmquist, S. Hu, S.L. Urban, J.R. Lokensgard, Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis, *J. Immunol.* 181 (2008) 6417–6426.
- [19] C.P. Marques, S. Hu, W. Sheng, M.C. Cheeran, D. Cox, J.R. Lokensgard, Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia, *Glia* 47 (2004) 358–366.
- [20] H. Minagawa, K. Hashimoto, Y. Yanagi, Absence of tumor necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex type 1 infections, *J. Gen. Virol.* 85 (2004) 343–347.
- [21] M.L. Nogueira, R.C. Siqueira, N. Freitas, J.B. Amorim, C.A. Bonjardim, P.C.P. Ferreira, F. Oréfice, E.G. Kroon, Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in the vitreous samples from patients with necrotizing retinitis, *J. Clin. Pathol.* 54 (2001) 103–106.
- [22] S. Okabe, M. Sugauma, Y. Imayoshi, S. Taniguchi, T. Yoshida, H. Fujiki, New TNF- α releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, *Megusurino-ki, Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 1145–1148.
- [23] K.A. Papadakis, S.R. Targan, Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors, *Gastroenterology* 119 (2000) 1148–1157.
- [24] C. Shimeld, J.L. Whiteland, N.A. Willians, D.L. Easty, T.J. Hill, Cytokine production in the central nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1, *J. Gen. Virol.* 78 (1997) 3317–3325.
- [25] T.L. Sørensen, M. Tani, J. Jensen, V. Pierce, C. Lucchinetti, V.A. Folcik, S. Qin, J. Rottman, F. Sellebjerg, R.M. Strieter, J.L. Frederiksen, R.M. Ransohoff, Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 807–815.
- [26] D. Taub, T. Sayers, C. Carter, J. Ortaldo, Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity, *J. Immunol.* 155 (1995) 3877–3888.
- [27] M.C. Vilela, D.S. Mansur, N. Lacerda-Queiroz, D.H. Rodrigues, R.M. Arantes, E.G. Kroon, M.A. Campos, M.M. Teixeira, A.L. Teixeira, Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study, *Neurosci. Lett.* 445 (2008) 18–22.
- [28] M.C. Vilela, D.S. Mansur, N. Lacerda-Queiroz, D.H. Rodrigues, G.K. Lima, R.M. Arantes, E.G. Kroon, M.A. da Silva Campos, M.M. Teixeira, A.L. Teixeira, The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe herpes simplex encephalitis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1153 (2009) 256–263.