

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOVRÍ"

Vicedirección de Parasitología

TÍTULO: " Evaluación de parámetros clínicos, conductuales e histopatológicos en el modelo de infección de ratones C57BL/6 /Cenp con Plasmodium berghei Anka"

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología.

Autor:

Mario Enrique García Dr MVZ

Tutores:

Dra Virginia Capó de la Paz. DrCs. Profesora titular.

Lic. Judith Mendiola Martínez. MSc. Investigadora auxiliar. Profesora asistente.

LA HABANA

2015

RESUMEN

La infección de ratones C57BL/6 con *Plasmodium berghei* Anka proporciona un modelo experimental de los procesos patológicos que ocurren en la infección por *Plasmodium falciparum* denominados malaria cerebral (MC). Diversos factores como la edad, las condiciones genéticas de los animales, su dieta y la heterogeneidad interindividual pueden modificar la presentación de esta afección neurológica en el modelo. El objetivo de este trabajo fue determinar las características clínicas y conductuales de la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka. Para cumplir este objetivo, el modelo se implementó en los laboratorios de Parasitología y Bioterio IPK y se aplicaron métodos descritos previamente para evaluar los signos clínicos y la conducta de ratones infectados con *P. berghei* Anka y controles. La información individual obtenida se reflejó en una ficha de supervisión y los datos generales se analizaron por métodos estadísticos. Se identificaron los ratones infectados en estado severo no solamente a partir de la aparición de signos neurológicos, además por la presencia de dificultad respiratoria, piloerección y descenso en la temperatura y peso corporales. La parasitemia se incrementó por encima del 7% en el desarrollo de la malaria cerebral experimental (MCE). Las puntuaciones en las pruebas de actividad locomotora, la maniobra en alambre y la conducta de transferencia indicaron el progreso hacia la MCE. Se describió la presencia de microhemorragias y extravasación extensa de eritrocitos en secciones del encéfalo de los ratones en estado terminal con signos neurológicos. Estos resultados contribuyen a la aplicación temprana del punto final humanitario y la utilización de este modelo en investigaciones posteriores.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios quien me dio en todo momento la fé necesaria para seguir adelante.
- ❖ A mis tutoras las cuales pusieron todo su empeño en brindarme sus conocimientos y ayuda para culminar esta tesis.
- ❖ A mi querida esposa por brindarme su amor y su apoyo en todo momento.
- ❖ A mi familia por brindarme siempre la confianza que necesité.
- ❖ A todos mis amigos y compañeros de trabajo en los cuales siempre encontré ayuda.
- ❖ A todas aquellas personas que de una forma u otra tuvieron que ver con el desarrollo de esta tesis.
- ❖ A la Revolución Cubana, que me posibilitó estudiar una profesión que me permite cada día trabajar por el bienestar, la salud y la felicidad de mis semejantes.

DEDICATORIA:

Este trabajo ha sido el resultado del amor y dedicación de todas aquellas personas que de una forma u otra han estado involucradas: muy especialmente a mis tutoras por su gran ayuda y a mi familia que de una forma u otra, en los momentos buenos y malos, me han apoyado, proporcionándome la inspiración para seguir adelante.

INDICE

	Pág.
Introducción	1
Objetivo general y objetivos específicos	4
Capítulo 1.- Marco teórico	5
1.1 Paludismo. Introducción.	5
1.2 Ciclo biológico de los parásitos causantes del paludismo	5
1.3 Fisiopatología general de la enfermedad	8
1.4 Características clínicas.	10
1.5 Malaria severa producida por <i>P. falciparum</i> .	11
1.6 Diagnóstico	15
1.7 Tratamiento.	16
1.8 Modelos experimentales de malaria cerebral.	17
1.9 Malaria cerebral experimental (MCE) producida por <i>Plasmodium berghei</i> Anka.	18
1.10 Herramientas para estudiar el proceso de enfermedad en la MCE.	21
1.11 Aspectos generales sobre la ética para la experimentación con modelos animales.	24
1.12 El principio de las tres R's como imperativo ético y de calidad.	25
1.13 Fichas de supervisión.	26
1.14 Límites en la severidad de los procedimientos y su implementación.	26
1.15 Punto final humanitario (PFH) en la experimentación biomédica que utiliza animales.	27
Capítulo 2.- Materiales y métodos	28
2.1.- Diseño metodológico.	28
2.2.- Definición de las variables y sus indicadores.	28
2.3.- Técnicas y Procedimientos	29
2.3.1.- Modelo de infección.	29
2.3.2.- Evaluación del estado clínico de ratones de la cepa C57BL/6/Cenp durante la infección con <i>P. berghei</i> Anka.	30
2.3.3.- Observaciones conductuales adicionales mediante pruebas de los reflejos, estado nervioso, funciones motoras y sensoriales.	33
2.3.4.- Análisis histopatológico de los encéfalos de animales infectados y	35

controles.	
2.4.- Análisis estadístico de los datos	36
2.5.- Consideraciones éticas	36
Capítulo 3.- Resultados	38
3.1.- Características clínicas de la malaria experimental producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con <i>P. berghei</i> Anka. Identificación de indicadores apropiados para el PFH en este modelo.	38
3.2.- Resultados de las observaciones conductuales adicionales mediante pruebas de los reflejos, estado nervioso, funciones motoras y sensoriales.	45
3.3.- Características histopatológicas de la malaria experimental producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con <i>P. berghei</i> Anka.	48
Capítulo 4.- Discusión	52
Conclusiones	63
Recomendaciones	64
Referencias bibliográficas	65

INTRODUCCIÓN

Significativos progresos en la reducción del número de casos de malaria se han obtenido como resultado de más de 10 años de intenso batallar para su control¹. Sin embargo, debido a que la transmisión continúa, se estimaron 207 millones de casos de malaria a nivel mundial en el año 2012. La mayoría de los casos (80%) ocurrieron en África subsahariana. Se reportaron 627000 muertes a la Organización Mundial de la Salud, de estas 90% ocurrieron en África subsahariana y 77% correspondieron a niños menores de 5 años². La transmisión de la malaria en América Latina y el Caribe se mantiene en 21 países, aunque la contribución a la morbilidad global es significativamente menor que en las otras áreas endémicas, así como a la mortalidad³. En este contexto, la emergente resistencia a los insecticidas y los fármacos antimaláricos representan una amenaza real a los avances que se han alcanzado⁴. Por otra parte, en áreas libres de esta enfermedad, el número de casos importados a través de viajeros e inmigrantes se incrementa en la actualidad lo cual hace necesario mantener una adecuada vigilancia epidemiológica⁵⁻⁷.

Entre las complicaciones de mayor peligro para la vida que ocurren durante una infección con *Plasmodium falciparum* se encuentra la malaria cerebral (MC)^{8,9}. Aunque la incidencia de MC es difícil de calcular¹⁰, estudios prospectivos de casos de malaria severa realizados recientemente en hospitales de Camerún aseveraron que la MC fue el principal factor de riesgo asociado con la muerte en edad pediátrica¹¹. En un estudio reciente en Senegal, se reportó una letalidad de 11.1% del total de casos hospitalizados diagnosticados con malaria severa, en los que los principales factores de riesgo fueron la edad, el estado de coma, la dificultad respiratoria y la hipoglicemia¹². Por otra parte, la infección con HIV-1 se mostró asociada con la presentación clínica de MC en niños de Uganda¹³, a lo cual se añade que investigaciones recientes aportan evidencias de que la MC y otras formas de malaria severa tienen consecuencias sobre el desarrollo de varias esferas cognitivas de los infantes¹⁴⁻¹⁶.

Es imprescindible comprender los procesos fisiopatológicos de la MC para poder desarrollar medidas preventivas, métodos diagnósticos o terapias adjuntas. Sin embargo, aún se presentan grandes retos en la elucidación de los eventos sistémicos y locales determinantes¹⁷⁻¹⁹. Estas investigaciones afrontan dificultades en las áreas endémicas tales como la limitación de recursos para métodos imagenológicos, la realización de estudios de intervención, el examen histopatológico de encéfalos de los casos fatales, el estudio evolutivo de los casos que se resuelven en respuesta al tratamiento; además existen estudios que solo pueden realizarse con modelos animales^{14, 20}.

El uso de los animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas representa una herramienta fundamental²¹. Los primates constituyen modelos para la MC, pero su uso está limitado por su costo y consideraciones éticas. Los modelos de mayor accesibilidad son aquellos en los que líneas de ratones consanguíneos tales como C57BL/6 y CBA infectados con *Plasmodium berghei* Anka o la cepa letal XL de *Plasmodium yoelii* desarrollan afecciones neurológicas^{9, 22}.

La infección de ratones C57BL/6 con *P. berghei* Anka proporciona un modelo de malaria cerebral experimental (MCE) que replica muchos eventos que se observaron en pacientes con MC. En los estudios histológicos, diversos autores reportaron indicadores similares de vasculopatía severa^{22, 23}. Aunque no existen evidencias histológicas sustanciales del secuestro de eritrocitos en los vasos sanguíneos encefálicos de los ratones, este modelo provee un espacio para la investigación sobre los procesos inflamatorios y la respuesta inmune en humanos. Las afecciones neurológicas causadas por la infección con parásitos del género *Plasmodium* en ambos hospederos se consideran enfermedades inflamatorias en las cuales participa la activación del endotelio vascular. Esta activación produce un aumento de la acumulación de células del sistema inmune en el encéfalo tales como macrófagos/monocitos, leucocitos, linfocitos T particularmente CD8+ y plaquetas; paralelamente ocurre un aumento de la concentración relativa de citoquinas pro-inflamatorias^{20, 24}.

En este modelo murino se describe variabilidad en la incidencia, expresión y el momento de comienzo de las manifestaciones neurológicas debido a diferentes factores de la relación hospedero-parásito. Las condiciones genéticas de los animales de acuerdo al suministrador, la edad de los animales, su dieta, y la heterogeneidad interindividual se describen como factores claves²⁵. Varias sublíneas C57BL/6 han mostrado diferencias fenotípicas²⁶ lo cual pudiera modificar los resultados de este modelo con los ratones suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) que actualmente constituyen la sublínea Cenp²⁷. También modulan la ocurrencia de MCE: la dosis del inóculo, el curso de la parasitemia y las variaciones clonales del parásito²⁵. A esto se adiciona que existen hallazgos contradictorios asociados con la histopatología de la MCE que pueden deberse a los factores mencionados previamente y a la ausencia de un protocolo universal para realizar estos estudios²⁸.

Estas variables determinan la necesidad de investigar, en los laboratorios de Parasitología del IPK, si la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka muestra las características clínicas y conductuales de una afección neurológica fatal en la mayoría de los infectados y si este estado se relaciona con la presencia de cambios en la histomorfología de secciones del encéfalo. Por la severidad de esta enfermedad, este estudio debe contribuir a identificar tempranamente a los animales que desarrollan estado terminal acompañado de signos neurológicos. La implementación de una ficha de supervisión y el análisis de los resultados podrían brindar la información necesaria para el rediseño de experimentos con este modelo con una reducción del índice de severidad de los procedimientos sobre los animales, de acuerdo a los lineamientos éticos nacionales.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de contribuir a fundamentar la implementación de la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka para investigaciones posteriores, en particular, para las evaluaciones de nuevas alternativas terapéuticas en un contexto similar al de su uso en el tratamiento de pacientes con MC.

OBJETIVOS

General:

Determinar las características clínicas y conductuales de la enfermedad causada por *P. berghei* Anka en ratones C57BL/6/Cenp.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la presentación clínica de la malaria experimental producida por *P. berghei* Anka en ratones C57BL/6/Cenp
2. Evaluar indicadores conductuales adicionales relacionados con afectaciones neurológicas en el curso de la enfermedad severa.
3. Determinar los indicadores apropiados para el punto final humanitario en este modelo.
4. Caracterizar los principales hallazgos histopatológicos en tejidos encefálicos post-mortem.

CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO

1.1- Paludismo. Introducción.

El paludismo o malaria es una enfermedad infecciosa transmitida por mosquitos del género *Anopheles* causada por protozoos del género *Plasmodium*. Este género pertenece a la familia Plasmodiidae y orden Eucoccida. Cuatro especies: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. ovale* pueden causar enfermedad en humanos. La gran mayoría de los casos de malaria severa se producen por la infección con la especie *P. falciparum*²⁹.

Plasmodium knowlesi es un parásito de simios que infecta principalmente a especies de macacos del sudeste de Asia. Su capacidad para infectar humanos se conoce desde la primera mitad del pasado siglo, pero las infecciones por *P. knowlesi* se han diseminado recientemente y adquieren importancia por su morbilidad³⁰. Históricamente, *P. knowlesi* ha constituido una herramienta para el estudio y avance de los conocimientos sobre la biología de los parásitos de la malaria³¹.

El género *Plasmodium* incluye más de 100 especies de las cuales 22 infectan a monos y 82 son agentes patógenos para reptiles y aves²⁹. Existen cuatro especies del género *Plasmodium* que infectan naturalmente a roedores de África central y de forma artificial a ratones, ratas y hamsters³². Esto ha permitido el desarrollo de modelos experimentales²¹.

1.2- Ciclo biológico de los parásitos causantes del paludismo.

La biología de todas las especies de *Plasmodium* que afectan a humanos es generalmente similar y consiste de dos fases diferentes: sexual y asexual. Los estados asexuales se desarrollan en los seres humanos, primero en el hígado y luego en los eritrocitos circulantes. Los estados sexuales se desarrollan en el mosquito^{29, 33}.

Estados asexuales:

Cuando la hembra infectada de *Anopheles* toma una ingesta de sangre, esta inyecta fluidos salivales en la lesión. Estos fluidos contienen esporozoitos que son las formas móviles del parásito, fusiformes, de 10 a 15 micras de longitud, que inician la infección. Al cabo de una hora, estas formas son eliminadas de la circulación y una parte de ellas penetran las células del parénquima hepático, mediante mecanismos que aún se desconocen. Una vez dentro de la célula hepática, los parásitos se reproducen asexualmente (esquizogonia exoeritrocítica). La longitud de esta fase y el número de merozoitos formados es una característica de cada especie en particular^{29, 33}.

Se considera que algunas formas tisulares hepáticas se desarrollan muy lentamente y pueden permanecer latentes por varios meses, a éstas se les ha denominado hipnozoitos. El fenómeno de recaída en ciertas malarias (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. cynomolgi*) consiste en la reaparición de parasitemia después de una adecuada terapia esquizonticida sanguínea. El origen de las recaídas no se ha explicado completamente, por lo que además de la presencia de hipnozoitos, se considera una hipótesis diferente que plantea que algunos esporozoitos no se desarrollan inmediatamente y se convierten en formas latentes. Cuando los merozoitos exoeritrocíticos salen tardíamente a la circulación, producen las recaídas. Para lograr la cura radical es necesario eliminar los parásitos circulantes en la sangre y los hipnozoitos. *P. falciparum* y *P. malariae* no desarrollan hipnozoitos, la cura radical necesita solamente fármacos para erradicar los parásitos en la circulación periférica. Con cualquiera de las especies de *Plasmodium*, se denominan recrudescencias a los casos en que la infección reaparece en sangre después del tratamiento que logró niveles no detectables de la parasitemia durante 2 a 3 semanas, pero fue inadecuado. El ciclo eritrocítico continúa aunque se presenta de forma subclínica o asintomática^{29, 33, 34}

Los merozoitos que emergen de las células hepáticas penetran a los glóbulos rojos e inician la fase del ciclo de vida en eritrocitos. Después de penetrar la célula, el parásito comienza a crecer, primero presenta una forma de pequeño

trofozoito en anillo y luego su tamaño aumenta hasta ocupar la mayor parte de la célula hospedera, se multiplica asexualmente y forma un esquizonte con varios merozoitos. Los parásitos digieren hemoglobina y forman como subproducto el pigmento llamado hemozoína. Esta fase se completa cuando se rompe el esquizonte maduro y libera merozoitos listos para invadir nuevos glóbulos rojos^{29, 33}.

La infección con merozoitos de la fase eritrocítica también puede ocurrir a través de donaciones de sangre, o por contaminación de agujas infectadas. La transmisión transplacentaria ocurre raramente^{29, 33}.

Estados sexuales:

Una parte de la población de parásitos intraeritrocíticos desarrolla gametogénesis. Se considera que todos los merozoitos derivados de un único esquizonte están destinados a su conversión en gametocitos hembras o machos, lo que sugiere que esta transformación se determina desde este ciclo asexual que antecede. Se desconocen los mecanismos moleculares que participan en el estímulo para la diferenciación de la célula a gametocito³⁵.

Los macrogametocitos (hembras) y microgametocitos (machos) son extraídos con la ingesta de sangre de la picada y completan su desarrollo solamente en el intestino de un mosquito *Anopheles*. Los gametocitos en general no presentan la membrana del eritrocito, los microgametos inician su exflagelación y división de la cromatina y como producto se forman 8 microgametos que al liberarse buscan a las células femeninas (macrogametos) para fecundarlas. Los cigotos resultantes se transforman en ookinetos vermiformes diploides los que penetran la pared del intestino y permanecen allí bajo la membrana basal. En un periodo de 24 horas posteriores a la ingesta de sangre, se forman ooquistes. A continuación se desarrollan los esporozoitos en el ooquiste, que están maduros al transcurrir entre 10 y 14 días, escapan del ooquiste e invaden las glándulas salivales. Cuando el mosquito pica a otro hospedero humano, el ciclo comienza de nuevo^{29, 33}.

1.3- Fisiopatología general.

En la malaria producida por *P. falciparum*, a diferencia de otras especies que afectan a los humanos, los glóbulos rojos infectados no permanecen en la circulación durante todo su ciclo de vida. Cuando los trofozoitos maduran, los glóbulos que los contienen se adhieren sobre la superficie de las células endoteliales de la microcirculación de varios órganos. Este fenómeno es llamado "secuestro" y se considera la causa de obstrucción vascular, disminución de la perfusión de tejidos y activación de citoquinas inflamatorias, eventos que están vinculados a las formas clínicas severas de la infección³⁶⁻³⁸.

La citoadherencia de *P. falciparum* ha sido atribuida a la interacción de diferentes clases de moléculas de origen parasitario y de ligandos presentes en el endotelio humano. Se destaca la interacción de proteínas de alto peso molecular, con variación antigénica, específicas de cepas (PfEMP1, del inglés, *erythrocyte membrane protein 1*), con receptores de la superficie del endotelio en venas y capilares. De todos los receptores potenciales identificados, ICAM1 (del Inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) es probablemente el más importante en el cerebro, el sulfato de condroitina en la placenta y el CD36 (del Inglés, *Cluster of Differentiation 36*, también se conoce como glicoproteína IV o receptor de trombospondina) para la mayoría de los otros órganos. Los eritrocitos infectados también se adhieren unos con otros y con eritrocitos no infectados formando rosetas. Estas interacciones causan el llamado secuestro de formas maduras del parásito en órganos vitales, particularmente en el cerebro, el cual se postula que por acción mecánica interrumpe el flujo sanguíneo y se afectan las funciones del endotelio vascular. Como consecuencia, solamente formas jóvenes en anillo de *P. falciparum* se encuentran en la circulación y los conteos de parásitos en sangre periférica subestiman el número total de parásitos en el organismo³⁶⁻³⁸.

En las otras especies que causan malaria no existe secuestro sustancial, de manera que todos los estadios de desarrollo se encuentran en las láminas de sangre periférica. *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* invaden selectivamente glóbulos rojos y las parasitemias son generalmente menores del 1%; *P. falciparum* y *P.*

knowlesi son menos selectivos y pueden alcanzar altas densidades parasitarias. En la malaria por *P. vivax*, los eritrocitos aumentan de tamaño y se deforman. Por el contrario, en las formas maduras de *P. falciparum* el eritrocito se hace esférico y rígido. Estos cambios se relacionan con la obstrucción de capilares y una menor supervivencia del glóbulo³⁸.

El hospedero responde a la malaria aumentando la función inmune esplénica y su función de eliminación de parásitos y eritrocitos no infectados. La ruptura del esquizonte libera materiales del hospedero y del parásito hacia el entorno extracelular, lo cual se considera que puede activar monocitos y macrófagos e inducir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, las cuales causan fiebre y otros efectos patológicos³⁸⁻⁴⁰.

Las infecciones por *P.vivax* y *P.ovale* se consideran en general de tipo benigno y raramente causan la muerte de los pacientes. Sin embargo, existen condiciones en que el cuadro puede ser grave como es el caso de ruptura esplénica, daño hepático, trombocitopenia y anemia severas²⁹.

En análisis post-mortem se observa frecuentemente que el bazo presenta un color oscuro, debido al pigmento palúdico (hemozoína), se halla aumentado de tamaño y es blando y friable. Está lleno de eritrocitos parasitados y presenta dilatación de los senos con hiperplasia reticular. La esplenomegalia blanda de las infecciones agudas graves contrasta con el bazo duro que se palpa en las infecciones repetidas⁴¹.

Durante los últimos 5 años fueron más frecuentes los reportes de enfermedad severa (principalmente anemia, aunque también se presentó fallo renal, hipoglucemia, ictericia y sangramiento anormal) y casos fatales en infecciones con *P. vivax* provenientes de Indonesia, Papua Nueva Guinea, India y de la región del Amazonas. Varios estudios informan una frecuencia entre 4 y 26% de coma en los casos severos, pero se requieren estudios clínico-epidemiológicos prospectivos para aclarar si estas manifestaciones severas son el resultado de co-infección con *P. falciparum*, de la emergencia de cepas virulentas, de la subestimación anterior de la severidad causada por esta especie o una sobredimensión del número de casos³⁸.

1.4- Características clínicas.

Las formas clínicas de la malaria varían, desde las formas asintomáticas hasta el progreso a las formas complicadas²⁹.

En áreas endémicas de malaria, esta infección es la causa más común de fiebre. Los primeros síntomas de la misma son inespecíficos. Pueden presentarse malestar general, dolor de cabeza, fatiga, dolores musculares y malestar abdominal, los cuales son seguidos por fiebre irregular. También son frecuentes las náuseas, el vómito y la hipotensión. Las convulsiones se asocian específicamente con la malaria por *P. falciparum* y pueden agravarse por la aparición de coma, en los casos de MC. En la mayoría de los pacientes con infecciones no complicadas los hallazgos físicos anormales son pocos, solamente fiebre, anemia ligera y después de varios días el bazo es palpable. El hígado aumenta de tamaño especialmente en niños pequeños, mientras en los adultos se observa una leve ictericia. En áreas de transmisión estable, las infecciones recurrentes causan anemia crónica y esplenomegalia en los niños pequeños³⁸.

Las manifestaciones clínicas de la malaria severa por *P. falciparum* dependen de la edad. La anemia severa y la hipoglicemia son más comunes en niños, sin embargo el edema pulmonar agudo, el daño renal agudo y la ictericia son más comunes en adultos, el coma por MC y la acidosis ocurre en todos los grupos de edad. La mortalidad aumenta cuando la proporción de eritrocitos infectados excede 2%. Sin embargo, la relación entre densidad parasitaria y pronóstico en la malaria por *P. falciparum* es muy variable^{9, 38, 42}. El tratamiento efectivo de la malaria no complicada evita que se produzca mortalidad²⁹.

La MC es una forma clínica de la infección con *P. falciparum* caracterizada por coma que persiste durante al menos 1 hora después del término de una convulsión o la corrección de hipoglicemia y sin la presencia de otras causas de encefalopatía⁸.

El cuadro clínico de la MC se instala gradual pero rápidamente. Se puede presentar cefalea intensa, cambios en la conducta y más tarde manifestaciones neurológicas diversas, como obnubilación mental, delirio, espasticidad,

hiperreflexia, Babinsky positivo, disartria, ataxia, clonus, alteraciones de la sensibilidad superficial, incontinencia, convulsiones tónico- clónicas, parálisis facial y trismo²⁹. En los niños, la MC comienza con una historia de 1 a 4 días de fiebre, toma del estado general, anorexia, irritabilidad, vómitos, tos y una o más convulsiones antes de la llegada del coma⁹. La diversidad de complicaciones neurológicas asociadas a la MC indica que se afectan varias áreas del encéfalo¹⁴.

1.5- Malaria severa producida por *P. falciparum*

Malaria cerebral:

La patogenia del coma en pacientes pediátricos con MC y los mecanismos que determinan el pronóstico de la enfermedad se encuentra en estudio. Varios mecanismos patogénicos han sido propuestos: el secuestro de eritrocitos parasitados que puede provocar la reducción de la perfusión tisular, el daño secundario a la respuesta inmune del hospedero frente a productos del parásito y el edema cerebral resultante de un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo, la contribución relativa de cada mecanismo al progreso de la enfermedad aún debe esclarecerse⁴³.

Históricamente, la información fundamental sobre la patogenia de la MC se ha obtenido mediante la integración de hallazgos de las autopsias con la información clínica registrada durante el manejo y tratamiento de los pacientes⁴⁴. Con esta metodología, estudios neuropatológicos previos de pacientes adultos con MC han mostrado la presencia de secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* en la microcirculación encefálica, anillos de hemorragias y granulomas de Dürck, además de daño axonal y afectaciones de la BHE⁴⁵. El secuestro se describe como la presencia de eritrocitos infectados en arteriolas pre-capilares y vénulas post-capilares que muestran un patrón de marginación de los glóbulos parasitados hacia la pared y una presencia mucho menor de éstos hacia el centro del vaso. Los capilares que las rodean aparecen parcial o completamente ocluidos^{46, 47}. También son características la marginación de monocitos y macrófagos dentro de los vasos y la presencia de macrófagos pigmentados, con eritrocitos parasitados⁴⁶.

Recientemente, se realizó un estudio patológico en varios órganos de 103 niños con MC de Malawi, África, y se demostró que el secuestro de eritrocitos infectados con *P. falciparum* puede estar presente en diferentes órganos⁴⁷ y se presenta asociado a perfiles específicos de la enfermedad que representan diferentes mecanismos de patogenia que pueden converger a producir la forma clínica de compromiso encefálico^{47, 48}. Esto se derivó del estudio de los casos que cumplieron los criterios clínicos de MC en el estudio mencionado, en el cual se presentaron hallazgos histológicos diferentes que se clasificaron en tres categorías: 1) se presenta secuestro de glóbulos parasitados en el encéfalo, 2) el secuestro está acompañado de microtrombos, hemorragias en anillo y pigmento malárico externo; 3) no se encuentra secuestro en el encéfalo⁴⁷.

La presencia de edema es uno de los hallazgos post-mortem más frecuente. Para todos los casos clínicos de MC incluidos en los estudios de niños de Malawi se clasificó de moderado a severo^{43, 47}. Se plantea que el edema puede causar daño al centro respiratorio, lo que coincidió con el registro de paro respiratorio como causa de muerte en la mayoría de los pacientes estudiados con MC. Se considera que la presencia de edema está asociada a un pronóstico fatal. Otros contribuyentes potenciales fueron la activación sistémica de la coagulación y las coinfecciones⁴⁷.

Aunque los mecanismos exactos que participan en la activación del endotelio encefálico no se conocen, es posible que dependa del contacto de factores del parásito o del efecto de mediadores solubles procedentes del parásito o de citoquinas circulantes. Las moléculas de *P. falciparum* que están asociadas a la inducción de cambios en el endotelio aún se desconocen. Las evidencias acumuladas sugieren que los eritrocitos parasitados adherentes inducen activación endotelial de la cual se derivan varias consecuencias. Entre estas se encuentran los cambios morfológicos y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión, las cuales fueron mencionadas previamente. El aumento de la permeabilidad de la BHE está asociado a la disminución de la expresión de las proteínas de unión intercelular. En condiciones normales, el endotelio vascular presenta una superficie interna no trombogénica. Se ha demostrado que la

exposición de células endoteliales a citoquinas induce actividad pro-coagulante y disminuye la fibrinólisis. Estas observaciones también han sido argumentadas por estudios de células endoteliales de vasos encefálicos en cultivo *in vitro*⁴³.

Otros estudios han centrado la atención en el estudio de la respuesta inmune en MCE y apuntan hacia la participación de citoquinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón- γ , interleucina-1 β ; interleucina-6) y anti-inflamatorias (interleucina-10 y factor de crecimiento y transformación- β), así como ciertas quimoquinas, en la patogenia de la enfermedad, aunque sus funciones inmunoregulatoras en la infección humana no se han definido^{9, 46}.

Desde el descubrimiento por Marchiafava y Bignami en 1894 de que los parásitos maláricos se hallan dentro del cerebro de los humanos durante la infección se ha centrado la atención en comprender los procesos fisiopatológicos que predisponen a la MC, lo cual permitiría desarrollar medidas preventivas o terapias⁴⁹. En un inicio, se plantearon teorías contrastantes sobre la participación del secuestro de parásitos en el encéfalo y de la respuesta inmune del hospedero; actualmente, se sugiere que la neuropatología es el resultado de la combinación de ambos procesos^{17, 19}.

Sin embargo, los estudios post-mortem no pueden demostrar inequívocamente la secuencia o causalidad entre los eventos patológicos asociados topográficamente y se hacen necesarios estudios electrofisiológicos, bioquímicos e imagenológicos durante el seguimiento de los pacientes, para la comprensión de cómo la malaria causa coma, daños encefálicos y muerte⁴³.

Anemia severa:

Se debe a la eliminación esplénica acelerada de los eritrocitos no parasitados principalmente, la destrucción de eritrocitos en la fase de esquizonte, unido a una eritropoyesis inefectiva³⁸. Esto se debe posiblemente a una supresión de la eritrogénesis en la médula ósea mediada por citoquinas⁴².

Acidosis e hipoglicemia:

La acidosis resulta de la acumulación de ácidos orgánicos como el ácido láctico. Con frecuencia coincide con cetoacidosis en niños y daño renal agudo en adultos. La acidosis láctica se deriva de la glicolisis anaeróbica en tejidos en los

cuales los parásitos secuestrados obstruyen el flujo de la microcirculación, en adición a la producción de esta molécula por los parásitos y los fallos hepáticos y renales para eliminar el lactato. Estudios consistentes evidenciaron que la hiperlactatemia es el resultado de un incremento en la producción y no una disminución en su eliminación⁴². Se discute la contribución causal de la hipovolemia⁵⁰. La hipoglicemia está asociada a la acidosis láctica. Se debe a un déficit de la gluconeogénesis hepática y a un incremento en el consumo de glucosa tisular³⁸.

Edema pulmonar:

El pulmón se afecta fundamentalmente en la infección grave por *P. falciparum*, también en infecciones con *P. vivax* y *P. knowlesi*, en las que se manifiesta como síndrome de dificultad respiratoria aguda. Los estudios histológicos revelan una membrana eosinófila en los sacos, los conductos alveolares y en los bronquiolos que contienen macrófagos y, en ocasiones, pigmento^{51, 52}. Aunque la patogenia no se entiende completamente, se observa un aumento de la permeabilidad capilar y se considera que es importante considerar el daño endotelial mediado por inflamación³⁸.

Daño renal agudo:

Es común en adultos. Se asocia frecuentemente con disfunción de otros órganos vitales causando una alta mortalidad o se desarrolla lentamente. Se comporta clínica y patológicamente como una necrosis tubular aguda, cuyo origen permanece sin esclarecer aunque se considera que la afectación del flujo de la microcirculación probablemente contribuye³⁸. El análisis histopatológico del riñón puede presentar dos tipos de lesiones diferenciadas: por un lado, una necrosis tubular secundaria a hemoglobinuria y mioglobinuria en infecciones graves por *P. falciparum* con parasitemia importante y, por otro, un síndrome nefrótico asociado a *P. malariae*, caracterizado por el engrosamiento de las paredes capilares de la membrana basal, debido al depósito de complejos antígeno-anticuerpo específicos⁵³.

Ictericia:

Es el resultado de la combinación de la hemólisis, el daño a los hepatocitos y colestasis. Es más frecuente en adultos que en niños y con frecuencia se acompaña de daño renal³⁸.

El hígado se encuentra con frecuencia aumentado de tamaño en las infecciones por *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*, aunque la disfunción hepática parece limitada a las dos primeras especies. Hay hiperplasia e hipertrofia de las células de Kupffer, que contienen pigmento y hematíes parasitados y no parasitados en su interior. En infecciones agudas graves pueden observarse lesiones necrótico-degenerativas en el área centrolobulillar. Las lesiones patológicas hepáticas se resuelven sin secuelas, tras el tratamiento adecuado⁵⁴.

Otros órganos afectados:

La placenta es uno de los órganos más afectados, ya que la circulación uteroplacentaria parece ofrecer condiciones favorables para la supervivencia y reproducción de *P. falciparum*. En los espacios intervillosos suelen encontrarse numerosos hematíes parasitados, a menudo con esquizontes maduros, células plasmáticas y macrófagos que contienen hemozoína. Otras lesiones incluyen el engrosamiento de la membrana basal del trofoblasto, hiperplasia del citotrofoblasto y necrosis del sincitiotrofoblasto. A menudo se observan fibrosis y necrosis fibrinoide de las vellosidades con depósitos de pigmento, en ausencia de hematíes parasitados. Las alteraciones patológicas se observan, fundamentalmente, en el lado materno de la placenta, siendo excepcional el hallazgo de eritrocitos fetales parasitados⁵⁵. La malaria provoca anemia y otras complicaciones severas en las embarazadas así como bajo peso de los recién nacidos³⁸.

1.6- Diagnóstico

El diagnóstico de certeza del paludismo consiste en la demostración de *Plasmodium* en la sangre. La historia epidemiológica puede ayudar en los casos de sospecha de malaria importada. El diagnóstico se establece por el examen microscópico de la sangre en una gota gruesa y un frotis sanguíneo, teñidos con la

tinción de Giemsa, Field o Romanowsky-eosina. En la gota gruesa los hematíes son lisados y acumulados en varias capas, por lo que la probabilidad de detectar parásitos es mayor que en el frotis. Sin embargo, no permite diferenciar la especie, para lo cual se requiere el examen detallado del frotis. Es una técnica sensible, rápida y fácil de realizar⁵⁶. El análisis cuantitativo de la parasitemia en frotis de sangre es la metodología preferida para las investigaciones con modelos experimentales de la malaria *in vitro* e *in vivo*⁵⁷.

En décadas pasadas, se desarrollaron e implementaron las pruebas de diagnóstico rápido que han demostrado su validez y las ventajas para el diagnóstico de la malaria en diferentes escenarios, pero su uso está limitado a las situaciones en que no se dispone de la microscopía. La mayoría de los juegos diagnósticos actualmente en el mercado proveen poca información sobre las especies o la densidad parasitaria. En busca de mejores límites de detección y la diferenciación de especies se han desarrollado las potencialidades de métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa, sobre los cuales se investiga actualmente para su perfeccionamiento⁵⁸.

1.7- Tratamiento.

La malaria no complicada en todas las áreas endémicas tiene como primera línea terapéutica actual la combinación de artemisinina con otros antimaláricos. Este es el caso de artemeter-lumenfantrina, artesunato-mefloquina, dihydroartemisinina –piperaquina. En las áreas en que la malaria por *P. falciparum* es sensible, es posible también utilizar artesunato y una dosis única de sulfadoxina-pirimetamina o artesunato y amodiaquina por tres días. En las áreas en que *P. vivax* es sensible y para *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* se puede utilizar cloroquina³⁸.

La malaria severa es una emergencia médica y necesita cuidados de enfermería intensivos y un manejo cuidadoso del paciente. El tratamiento de elección es artesunato intravenoso o intramuscular (también se puede aplicar a pacientes con infecciones severas con *P. vivax* o *P. knowlesi*³⁸).

En el tratamiento de la MC, la prevención del daño neurológico es también un importante objetivo. Debido a esto, se ha planteado una necesidad urgente de desarrollar terapias complementarias, tales como inmunomoduladores o agentes neuroprotectores que podrían ser administrados junto con los antimaláricos. Actualmente, la carencia de conocimientos sobre la patogenia de la MC provoca que las dianas más eficaces para intervenciones terapéuticas aún no se hayan identificado¹⁴. En la búsqueda de nuevas dianas, un gran número de intervenciones han sido experimentadas en modelos animales¹⁸.

1.8- Modelos experimentales de malaria cerebral.

Gran parte del conocimiento actual sobre la fisiología de los mamíferos ha provenido de estudios con animales. Los modelos experimentales han demostrado ser una valiosa herramienta para investigar la patogenia de numerosas enfermedades infecciosas y autoinmunes que padecen los seres humanos, así como han permitido el desarrollo de varias vacunas y terapias que están en uso en la actualidad. El uso de modelos experimentales puede ayudar significativamente en el estudio de la malaria cerebral. Entre los modelos de primates para MC tenemos las infecciones con *P. knowlesi* y *P. coatneyi* en monos Rhesus y con *P. falciparum* en monos ardilla, pero estos modelos resultan excesivamente costosos y presentan restricciones tales como trabajar solamente con un pequeño número debido a consideraciones éticas. Por ello se han desarrollado otros modelos en los que determinadas cepas de ratones consanguíneos infectados con varias cepas de *Plasmodium berghei* o la cepa letal (XL) de *P. yoelii* desarrollan afecciones neurológicas^{9, 22}.

1.9- Malaria cerebral experimental (MCE) producida por *Plasmodium berghei* Anka.

El modelo de infección con *P. berghei* Anka replica muchos eventos que se observan durante la MC humana y se acepta que es el mejor entre los disponibles^{18,20}. La infección de cepas de ratones susceptibles, tales como C57BL/6 y CBA, lleva al desarrollo de patologías cerebrales fatales, con signos clínicos tales como ataxia, parálisis, dificultad respiratoria, convulsiones y coma²². El momento de comienzo de los signos clínicos varía en dependencia de la dosis de infección, el fondo genético del hospedero y el clon específico de los parásitos infectantes, pero ocurre típicamente entre 5 y 10 días posteriores a la infección²⁵. Como en los humanos, existe un rápido deterioro en la condición de los animales infectados una vez que los síntomas clínicos severos aparecen y la muerte sobreviene en las posteriores 4 ó 5 horas⁵⁹.

En los encéfalos de ratones infectados con *P. berghei* Anka y que muestran signos de MCE se identifican múltiples áreas de ruptura de la BHE con escape del contenido vascular; la pérdida de poblaciones neuronales específicas en la corteza y el cuerpo estriado; la acumulación de eritrocitos parasitados dentro de los vasos sanguíneos y la inflamación perivascular focal^{22, 60}. La acumulación vascular de monocitos y macrófagos se considera un elemento clave de la MCE, así como la activación de células mononucleares residentes como los astrocitos y las células microgliales⁶¹.

Diferentes mecanismos patogénicos han sido propuestos para explicar el daño vascular y la ruptura de la BHE en la MCE. Por una parte, existen hipótesis que plantean que la vasculopatía de la MCE es un proceso de origen multifactorial en el que la sobre-estimulación de la respuesta inflamatoria del hospedero juega un papel fundamental. También se ha sugerido que la interacción entre los glóbulos rojos infectados, los monocitos y las células endoteliales es el factor estimulante de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas el TNF- α e IL-1 β , las cuales activan el endotelio vascular. Otras hipótesis adicionan el reclutamiento y secuestro de eritrocitos infectados, monocitos y plaquetas como factores que contribuyen a la oclusión mecánica y potencian la activación de

células endoteliales, así como la sobre-expresión de moléculas de adhesión celular que pueden amplificar el proceso de adhesión de eritrocitos infectados, monocitos y plaquetas que al obstruir los vasos y afectar el flujo sanguíneo, causan vasoconstricción, isquemia focal e hipoxia. Es probable que estos eventos se relacionen con las afectaciones a la BHE, lesiones hemorrágicas y edema que permiten que materiales extraños penetren al parénquima^{19, 62, 63}.

Los estudios de modelos experimentales, en especial con *P. berghei* Anka, indican que la MCE es una enfermedad mediada por linfocitos T. La mayor parte del escenario fisiopatogénico de la MC ha sido descrito basándose en los modelos murinos. En particular, se considera que los linfocitos T citotóxicos (CD8+) tienen un papel significativo en la regulación de la patología vascular que ocurre en esta enfermedad. La respuesta inmune descontrolada y perjudicial es principalmente del tipo Th1, con superproducción de algunas citoquinas, tales como IFN γ , combinada con la subproducción de otras como la IL- 10. Sin embargo, no existe una definición clara de la secuencia de eventos durante el curso de la enfermedad⁶⁴.

La pieza clave de la información que no ha sido posible encontrar en la MCE por *P. berghei* Anka es la evidencia histológica directa de la adherencia de eritrocitos parasitados en los vasos encefálicos en una forma similar a la observada en la MC humana. Los eritrocitos infectados con *P. berghei* Anka se han observado atrapados por leucocitos adherentes los que eventualmente contribuyeron a la obstrucción vascular^{28, 65, 66}. Carvalho⁶⁷ considera que la interacción directa de eritrocitos parasitados con el endotelio no se evidenció porque es de muy corta duración.

Si consideramos que la MC humana comprende más de un acontecimiento patológico y diferentes condiciones vasculares, entonces los modelos de ratón e incluso de primates estarían dirigidos a develar solamente aquellos procesos similares a la infección humana²⁰. Por ejemplo, los cambios en el microambiente de la célula endotelial que se pueden producir por la citoaderencia y por la inflamación ocasionan en ambos casos que las células endoteliales asuman un fenotipo pro-inflamatorio y pro-coagulante. Si los leucocitos reemplazan a los

eritrocitos infectados como los principales y no los únicos agentes obstructivos igualmente se desarrolla la obstrucción mecánica del flujo sanguíneo⁶⁷. Del mismo modo, el estudio de la adhesión de los eritrocitos parasitados con *P. berghei* Anka a células CD36⁺ tiene relevancia para la MC humana⁶⁸. Debido a que las consecuencias de la infección parecen ser muy similares, aunque el tipo de célula que es secuestrada en la MC humana o murina sea diferente, se fundamenta la elección de este modelo para probar intervenciones terapéuticas⁶⁷. Sin embargo, se ha planteado que se desconoce si la citoadherencia de *P. falciparum* es la causa patológica fundamental de esta complicación del paludismo por lo que se recomienda continuar las tentativas investigativas que definan la patogenia en ambos hospederos²⁰.

Por otra parte, las pruebas terapéuticas llevadas a cabo sobre la base de los estudios de la fisiopatología de la MC en humanos, tales como administración de anticuerpos anti-TNF, terapias anticonvulsivas, administración de fluidos, etc, no han sido particularmente útiles para reducir la mortalidad de esta forma severa⁶⁹. Ello refleja la complejidad de esta enfermedad y las deficiencias que aún existen en el conocimiento de su desarrollo. En la mayoría de los estudios de laboratorio realizados con modelos murinos, los fármacos o inhibidores se han administrado antes del desarrollo de los síntomas neurológicos. Esto ha dado lugar a un desacuerdo entre los resultados dramáticamente beneficiosos de las intervenciones en modelos murinos y los resultados posteriores en pruebas con pacientes¹⁸. Solamente se ha logrado un acercamiento hacia la comprensión del proceso patológico, pero no necesariamente a identificar terapias efectivas²⁰.

Con vistas a atenuar estas limitaciones, se recomienda la implementación de las evaluaciones de las nuevas alternativas terapéuticas en modelos de MCE a través de esquemas en los que éstas se administren de conjunto con las drogas antimaláricas de referencia y una vez que los síntomas neurológicos ya se han desarrollado, ya que éste es el contexto real de su uso en el tratamiento de pacientes con MC⁷⁰⁻⁷².

1.10- Herramientas para estudiar el proceso de enfermedad en la MCE.

Los estudios experimentales iniciales de la MCE con *P. berghei* Anka determinaron la presencia de signos neurológicos a través de la aplicación de unas pocas características clínicas, tales como la presencia de estado de coma y convulsiones²². Posteriormente, para estudiar el proceso de enfermedad de la MCE en una manera reproducible se han utilizado varios protocolos, entre ellos el protocolo SHIRPA (*SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, Royal Hospital London, St. Bartholomew's and Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment*)^{25, 59}. Este es un protocolo sistemático, aceptado para determinar el perfil de cambios funcionales y semicuantificar estados conductuales en ratones.

Rogers et al⁷³ (1997) propusieron el uso de este protocolo para identificar y caracterizar trastornos derivados de anormalidades en el genoma de ratón. Cada prueba provee información acerca del perfil funcional de un sistema en particular, pero las pruebas en su conjunto constituyen un proceso de diagnóstico general, neurológico y conductual. Por ejemplo, la medición de la actividad locomotora aporta datos de la función integrada de la corteza, el control cerebral de la locomoción y la función neuromuscular. Si se toma aisladamente es un indicador aproximado, pero cuando se combina con mediciones de fuerza motora y control neural, a través de las pruebas de fuerza de agarre y tono límbico, este conjunto ayuda a definir deficiencias específicas.

Estos autores también plantean que las pruebas de la posición del cuerpo, la elevación de la cola, fuerza de agarre, tono abdominal y corporal, actividad locomotora, tono y posición límbicos, reflejo postural, marcha, colocación visual, así como el balance y la coordinación permiten evaluar la función espino-cerebelosa. La función sensorial puede ser medida a través de la conducta de transferencia, los reflejos corneales, posturales y otros, la posición límbica, la marcha, la colocación visual, etc. Entre los aspectos a evaluar en el comportamiento nervioso de cada animal se encuentra un grupo de pruebas

comunes a otros perfiles y se particulariza en el miedo, la ansiedad, respuesta de memoria y aprendizaje, irritabilidad, vocalización, pasividad en la posición, comportamiento estereotipado, consumo de agua y alimentos, catalepsia, agresión y respuesta a estímulos acústicos de bajo y alto nivel. Se miden además funciones autónomas⁷³.

Estas pruebas están distribuidas entre las tres etapas de las cuales consta el protocolo SHIRPA, principalmente en las etapas 1 y 2. Se realizan en una secuencia adecuada para los animales que permite a los investigadores luego de una observación detallada de la conducta en la etapa 1, pasar a confirmar y cuantificar los efectos observados en una segunda etapa. Esta última comprende pruebas de la actividad locomotora, el consumo de agua y alimentos, pruebas de balance y coordinación, analgesia, modificaciones histológicas, bioquímicas y pruebas adicionales específicas de la investigación⁷³.

En el caso de modelos potenciales de enfermedad neurológica se desarrolla una tercera etapa en la cual las pruebas específicas incluyen las de aprendizaje y memoria, ansiedad, respuesta a estímulos acústicos de bajo y alto nivel, electromiografías, electroencefalografías, conducción nerviosa y neuroimágenes⁷³.

En la actualidad se desarrollan herramientas de gran resolución para investigar los mecanismos patológicos de MC en humanos y animales de experimentación antes de la muerte. Existen diferentes modalidades de análisis de neuroimágenes, tales como la resonancia magnética, la tomografía computarizada, la tomografía de emisión de positrones y la microscopía *in vivo* que permiten estudios longitudinales del desarrollo del síndrome neurológico¹⁹.

Las evaluaciones de las funciones autónomas, sensoriales-motoras y de la conducta que utilizan protocolos estandarizados como es el caso del SHIRPA son muy útiles para ayudar a evaluar el estado clínico más amplio de los animales infectados de modo que los datos obtenidos a través de la aplicación de la batería de ensayos de este protocolo confirmaron que los animales que sufrieron MCE desarrollaron trastornos funcionales y conductuales en el curso progresivo de la enfermedad, al compararlos con animales controles sanos y animales infectados

sin daño neurológico^{25, 59}. Estos indicadores estuvieron en estrecha relación con la intensidad de los daños histopatológicos observados en los encéfalos. Las alteraciones tempranas en los reflejos, el sistema sensorial y el comportamiento nervioso se asociaron con la presentación de enfermedad encefálica en los animales infectados⁵⁹.

La presentación de signos clínicos bien reconocidos de MCE tales como la ataxia, la parálisis límbica, las convulsiones, la hipotermia de moderada a severa, la pérdida del reflejo postural y/o coma, se han propuesto como guías en la decisión de aplicación de tratamientos en los protocolos experimentales. Sin embargo, estos signos generalmente aparecen en estados muy tardíos de la enfermedad, en pleno desarrollo de la MCE. Por el contrario, el tratamiento de la infección desde el día 5, cuando la parasitemia es moderada y en ascenso, pero los signos de MCE están ausentes, solo permite evaluar la eficacia y rapidez en la eliminación de parásitos por el fármaco en estudio a diferentes dosis y cuáles de éstas previenen la recrudescencia^{74, 75}.

Si el tratamiento se realiza posterior al día 6 post-infección, los animales se encuentran en condiciones variables y en este contexto las pruebas derivadas del protocolo SHIRPA han demostrado su validez para una evaluación clínica de cada uno de ellos. En estado de pleno desarrollo de la MCE, se demostró que las administraciones de artemeter a 25 mg/kg y de artesunato a 32 mg/kg fueron efectivas en rescatar aproximadamente el 40% de los animales. Estos fueron evaluados mediante pruebas tales como la conducta de transferencia, actividad locomotora, elevación de la cola, maniobra en alambre, reflejo postural, temperatura rectal y de la observación de los signos clínicos severos de MCE. En el estudio mencionado, los animales se comenzaron a tratar con conteos entre 4 y 8 puntos y los supervivientes llegaron a recuperar la totalidad de los 24 puntos, luego de la administración de cinco dosis diarias de los fármacos⁷². Es importante además la evaluación de las consecuencias de la enfermedad sobre la conducta posterior de los animales supervivientes^{71, 76, 77}.

1.11- Aspectos generales sobre la ética para la experimentación con modelos animales.

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos son insustituibles hasta la fecha⁷⁸.

A partir de 1940 se inició la creación de una nueva especialidad dentro de la medicina veterinaria: “la ciencia de los animales de laboratorio”. Esta ciencia se basa en investigaciones, normas, principios y legislaciones. En Estados Unidos, Canadá, la Comunidad Económica Europea y Japón, existen instituciones cuyas legislaciones nacionales regulan el uso de los animales de laboratorio. Podemos mencionar a *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)*; *Canadian Council of Animal Care (CCAC)* y *Federation of European Laboratory Animal Science (FELASA)*, entre otras. Estas instituciones han publicado guías con reconocimiento internacional donde se detallan las normas y las recomendaciones generales para el cuidado y uso de los animales en forma científica, técnica y humanitariamente apropiada, así como sobre la planificación y conducción de los experimentos con animales⁷⁸. Las guías para la investigación con animales en Cuba fueron publicadas en el año 2013 por el Centro Estatal para el Control de los Medicamentos y Diagnosticadores (CECMED)⁷⁹.

El eje central de estas regulaciones está dado por la aplicación del Principio de las 3 R formulado por Russel y Burch⁸⁰ en Inglaterra y por la constitución de comités institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio⁸¹ quienes tienen como misión evaluar los protocolos de investigación y asegurar que todos los procedimientos se realicen acorde a las reglamentaciones vigentes.

1.12- El principio de las tres R como imperativo ético y de calidad.

Russel y Burch⁸⁰ expusieron por primera vez la vinculación de la excelencia científica con el uso humanitario de los animales de laboratorio. Esta relación está basada en los tres principios éticos de la investigación con animales: Reducir, Reemplazar y Refinar. Estos fundamentos se relacionan con una estrategia racional e inteligente para minimizar el uso de animales y las causas de dolor y angustia⁸².

Los proyectos de investigación que requieren el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con el número mínimo necesario de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos. El perfeccionamiento del diseño de los experimentos y la selección del modelo mas adecuado, contribuyen al cumplimiento de este principio⁸³.

El refinamiento en experimentación animal ha sido definido como aquellos métodos que evitan, alivian o minimizan el dolor potencial, angustia u otros efectos adversos sufridos por los animales implicados, o mejoran el bienestar animal⁸⁴.

Las normas bioéticas adoptaron estos principios al recomendar utilizar siempre métodos alternativos cuando se disponga de ellos, realizar investigaciones bajo anestesia siempre que sea posible, utilizar las especies menos sensibles en la escala filogenética, proporcionar la analgesia adecuada, por ejemplo después de la cirugía; obtener asesoramiento profesional de los veterinarios y otras personas competentes cuando sea necesario; asegurar una formación y una competencia por parte de todo el personal; proporcionar la estabulación de las especies animales con fines de cría o experimentación en adecuadas condiciones ambientales; minimizar el dolor y el sufrimiento y reducir el número de animales al mínimo necesario y dar una adecuada justificación de la investigación en primera instancia⁸⁴.

1.13- Fichas de supervisión:

Para enfrentarse al problema de ser capaces de reconocer en qué momento el bienestar animal se compromete, se utilizan una serie de signos clínicos que contribuyen a evaluar el grado de severidad del experimento. Es necesario detallar los principales signos clínicos que pueden observarse y cuantificarse. Estos forman parte de una ficha de supervisión, que es el documento diseñado para recoger información relacionada con el curso del experimento en cada animal⁷⁹.

Las fichas de supervisión tienen que ser redactadas específicamente para cada procedimiento y para cada especie, en algunos casos, para cada línea o cepa a la que se le realiza el procedimiento, ya que raramente pueden generalizarse⁸⁴.

La información obtenida en la ficha de supervisión se utiliza para:

- identificar los signos relevantes para el ensayo.
- asignar valores que identifiquen la intensidad de los efectos
- establecer límites objetivos mediante valores que permitan de forma transparente evaluar a todos los animales por igual
- contribuir a la toma de decisión de que se ha alcanzado el punto final humanitario⁷⁹.

Además nos permite realizar un análisis retrospectivo de los efectos adversos de cualquier procedimiento científico y de su grado de severidad, así como las más cuidadosas observaciones de los animales desde el principio hasta el final del experimento⁸⁴.

1.14- Límites en la severidad de los procedimientos y su implementación

La Resolución 11-2013 del CECMED que puso en vigor la Regulación 64-2012 “Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los Comités Institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL)”⁷⁹ establece que cada procedimiento tiene un índice de severidad y se reconocen

tres escalas: ligera, moderada y severa. El sufrimiento severo no está permitido. Para interpretarlas acertadamente, se requiere una cuidadosa observación, donde las fichas de supervisión mencionadas que indican los signos clínicos cronológicamente se hacen inestimables. Estos índices representan grados de desviación de la normalidad, junto con otros indicadores de salud y calidad de vida. Este acercamiento integral que se alcanza con la ficha de supervisión puede ser utilizado para determinar el momento de punto final⁸⁴.

1.15- Punto final humanitario en la experimentación biomédica que utiliza animales.

El punto final humanitario (PFH) es el momento definido en el protocolo, en el cual el dolor o distrés en un experimento con animales se elimina o se reduce mediante la toma de acciones tales como el sacrificio humanitario, cese de los procedimientos dolorosos o mediante la aplicación de analgesia o anestesia⁷⁹.

En el pasado no era infrecuente confundir muerte con punto final⁸⁵. Sin embargo, la muerte está raramente relacionada con la variable experimental en estudio. No así efectos indirectos, como la deshidratación o la inanición de los animales incapaces de beber o comer. Debemos determinar los signos clínicos que preceden irrevocablemente a la muerte y utilizarlos para decidir el momento de punto final pre-letal. Esta idea de utilizar anticipadamente los signos clínicos para predecir otros posteriores requiere estudios de validación, donde se demuestre que los animales seguramente progresarán en este sentido y que el momento de punto final puede basarse en este hecho. Estos métodos pueden utilizarse en las pruebas de toxicidad, de nuevos medicamentos, de retos para medir la efectividad de una vacuna y evaluaciones de la virulencia de microorganismos o parásitos^{84, 86}.

CAPITULO 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Diseño metodológico.

Se realizó un estudio experimental en los laboratorios de Parasitología y Bioterio del IPK en el periodo mayo/2012 - Agosto/2014 en el cual se emplearon 57 ratones hembras C57BL/6/Cenp de 6 a 8 semanas de edad y peso entre 15 y 18g que fueron suministrados por el CENPALAB (los progenitores se importaron del Laboratorio JANVIER, Francia y se incorporaron a la producción de esta línea bajo las Buenas Prácticas de Producción); 47 fueron infectadas y 10 formaron parte del grupo control.

2.2.- Definición de las variables y sus indicadores.

Tabla 1.Descripción de las variables estudiadas, escalas y mediciones realizadas.

Nombre de la variable	Tipo de variable	Escala	Mediciones
Parasitemia	Cuantitativa continua	0-50%	Números absolutos
Descenso del peso corporal	Cuantitativa continua	0-30%	Porcentajes
Descenso de la temperatura	Cualitativa ordinal	0,1,2	Porcentajes
Día postinfección	Cuantitativa continua	0-24	Números absolutos
Apariencia externa	Cualitativa ordinal	0,1,2	Porcentajes
Severidad por signos neurológicos	Cualitativa ordinal	0,1,2,3	Porcentajes
Supervivencia	Cualitativa nominal	Sí, No	Porcentajes
Curso de la infección	Cualitativa nominal	-Infección en progreso a signos neurológicos d5-d11. -Enfermedad severa con signos neurológicos d5-d11. -Enfermedad sin signos neurológicos d5-d18.	Porcentajes
Conducta de transferencia	Cualitativa ordinal	0,1,2,3,4,5	Porcentajes
Actividad locomotora	Cualitativa ordinal	0,1,2,3,4	Porcentajes

Maniobra en alambre	Cualitativa ordinal	0,1,2,3,4	Porcentajes
Tono corporal	Cualitativa ordinal	0,1	Porcentajes
Reflejo postural en arena	Cualitativa ordinal	0,1,2,3	Porcentajes
Irritabilidad	Cualitativa nominal	Sí, No	Porcentajes
Presencia de hemorragias en tejidos encefálicos	Cualitativa ordinal	0,1,2,3,4	-

2.3.- Técnicas y Procedimientos

2.3.1.- Modelo de infección:

Los ratones se colocaron en jaulas en grupos de 5-6 animales con acceso libre al agua y los alimentos y bajo condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de 25 °C, humedad del 70 %. Estos animales se adaptaron a su nuevo ambiente por más de 3 días antes de comenzar los experimentos.

Los ratones fueron identificados con números del 1 al 7 en cada jaula, a través de pequeñas marcas en las orejas. Las marcas de las orejas se realizaron después de la desinfección de los pabellones auriculares, mediante pequeñas incisiones asépticas con tijera en los bordes de estos y en diferentes lugares: 1- exterior izquierdo (cerca del hocico), 2-centro izquierdo, 3-interior izquierdo (parte próxima al cráneo), 4-exterior derecho, 5-centro derecho y 6-interior derecho⁸⁷.

La cepa de *P. berghei* Anka (gentilmente donada por el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Universidad de Amberes, Bélgica) se propagó por pases sucesivos de eritrocitos parasitados a ratones C57BL/6. En cada experimento, una suspensión de glóbulos conteniendo 1- 2 x 10⁵ parásitos en 0,1 mL se inoculó intraperitonealmente en cada ratón ^{64, 68}.

Se determinó la parasitemia mediante la extracción de 2 µL de sangre mediante venopunción de la cola, preparación de extensiones finas, fijación con metanol y tinción con Giemsa. El conteo de eritrocitos parasitados se realizó según Schlichtherle *et al*⁵⁷.

Grupo Control:

Los ratones se mantuvieron en condiciones similares al grupo de infectados. Se examinaron al inicio de la serie experimental y los días paralelos a los infectados para confirmar que mantenían una conducta activa, acicalamiento, ingestión de agua y alimentos y socialización, indicativos de normalidad. En este grupo también se evaluaron las pruebas adicionales procedentes del protocolo SHIRPA según Lackner *et al*⁵⁹. Además se pesaron y se les midió la temperatura rectal.

2.3.2.- Evaluación del estado clínico de ratones de la cepa C57BL/6/Cenp durante la infección con *P. berghei* Anka.

Descripción de la ficha de supervisión:

Se realizaron las determinaciones y las observaciones que se mencionan a continuación (tablas 2 y 3) al inicio de cada serie experimental y a partir del día 5 postinfección, según los procedimientos descritos por Lackner *et al*⁵⁹, una vez al día, en horario de la mañana, por tres observadores. Las categorías de las observaciones siguieron las descripciones en los contenidos, glosario y videos educativos de la Asociación Holandesa para la Ciencia de Animales de Laboratorio⁸⁸. El peso se determinó en una balanza técnica (SCALTEC, Alemania). La temperatura rectal se midió con un termómetro digital (MABIS Healthcare Inc, China). El punto final humanitario (PFH) se definió para la presentación de inmovilidad, dificultad respiratoria, afectaciones neurológicas (parálisis, convulsiones) y estado terminal. El día de aplicación del PFH se consideró el día de la muerte.

Tabla 2. Ficha de supervisión que contiene los indicadores seleccionados para explorar el curso de la infección.

Identificación:		Días postinfección:						
	Día 0	5	6	7	8	9	10	11
Peso del animal								
Observaciones: 1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
Temperatura								
Parasitemia								
Punto final o muerte								

Tabla 3. Observaciones de la conducta y signos clínicos que se evaluaron en relación a la presentación de enfermedad severa y afectaciones neurológicas en el modelo de infección C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka de acuerdo a Lackner *et al*⁵⁹.

Observaciones	Categorías
Apariencia del pelaje	• Normal • Ligeramente erizado • erizado
Posición del cuerpo	• Completamente plana • Descansa de lado • Descansa de bruces • Encorvado • Sentado o parado • Apoyado sobre las patas traseras • Saltos verticales repetidos
Parálisis parcial	• Presente (en extremidades posteriores y cuello) • Ausente

Respiración	• Irregular • Lenta, superficial • Normal • Hiperventilación
Tremor	• Ninguno • Moderado • Marcado
Convulsiones	<u>Tipo clónico:</u> • Coordinada, asimétrica y movimientos con propósito. • Torsiones y espasmos simétricos de los miembros. • Clonus antecediendo una convulsión severa. • Bruxismo, clonus de la mandíbula • El animal salta como rosita de maíz • Asfixia, convulsión terminal clónica que resulta en falla respiratoria. <u>Tipo tónico:</u> • Extensión mantenida de las patas traseras, antecedita de una flexión tónica. • Opistotono (cabeza, tronco y extremidades están arqueados para atrás rígidamente). • Emprostono- lo opuesto, rígidamente encogidos. <u>Tipo mixto:</u> • Animal bocarriba, intenta ponerse de pie y rueda de un costado para otro o hacia el mismo lado. • Descansa sobre las patas traseras y se queda parado durante la convulsión. • Convulsión en la que el animal adopta postura de persona rezando.
Comportamiento estereotipado	Movimientos de cabeza, mordida o lambida compulsivas, mordida autodestructiva, otros.
Desplazamiento	• Ninguno • Avanza un poco y se detiene • desplazamiento con inestabilidad • Mayor desplazamiento

Análisis de las observaciones para la caracterización clínica y conductual:

Para el análisis de la severidad de la enfermedad producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka se utilizó la escala de puntuación de Waknine-Grinberg *et al*⁶⁴ con algunas modificaciones (tabla 4).

Tabla 4. Escala de puntuaciones para analizar la severidad de la enfermedad producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka.

Observaciones	Descripción	Escala
Signos clínicos severos	No se observan	0
	Encorvamiento, desplazamiento con inestabilidad	1
	Movimiento limitado, tremor, parálisis parcial	2
	Dificultad respiratoria, posición de lado o plana, convulsiones.	3
Temperatura rectal	36-38 °C	0
	35-36 °C	1
	< 35 °C	2
Apariencia externa	Normal	0
	Piloerección ligera	1
	Piloerección fuerte	2

Con los resultados de este análisis se realizó una redefinición del punto final para evitar que los animales desarrollen una severidad extrema, de acuerdo a las regulaciones nacionales.

2.3.3.-Observaciones conductuales adicionales mediante pruebas de los reflejos, estado nervioso, funciones motoras y sensoriales.

Posterior a las observaciones realizadas de la conducta y signos clínicos que aparecen en la Tabla 3, cada animal fue colocado en un cilindro de metal, tapado con un cartón grueso y el animal se transfirió rápidamente al fondo de una jaula de bioterio (55x33x18cm) con un papel blanco cuadriculado en el fondo (15 cuadrados de 11cm). Inmediatamente se midió el tiempo de reacción con un cronómetro. Posteriormente se midió en 30 segundos, el número de cuadrados que recorre el ratón. A continuación se tomó al animal por la cola y sujetado a la rejilla se haló hacia atrás y se examinaron los costados del animal para medir el tono abdominal. También a partir de sujetar el animal por la cola se llevó a ejecutar la maniobra sobre un alambre horizontal, rígido de 3 mm de diámetro, fijado a la esquina derecha de la jaula, en forma transversal, que soporta el peso del ratón. En esta prueba el animal se aseguró por la cola y se bajó para permitir que las patas delanteras agarraran el alambre. El cuerpo se mantuvo en

extensión, en posición horizontal y se dejó suelto. Luego se utilizó el agarre por la cola para observar la respuesta a la prueba de reflejo postural. Esta prueba consiste en tirar el animal para atrás en el aire de modo que cuando lo suelten desarrolle un salto mortal y se observa la respuesta. Al colocarlo en posición supina, se midió la temperatura rectal del animal y después se realizó la toma de sangre, para recoger datos que aparecen en la ficha (Tabla 2). Durante todo el procedimiento se prestó atención a las conductas de vocalización, irritabilidad o agresión. La secuencia de las pruebas se realizó según Rogers *et al*⁷³ y se utilizaron las escalas de respuestas descritas por Lackner *et al*⁵⁹ (Tabla 5).

Tabla 5. Escala de puntuaciones para evaluar las pruebas adicionales procedentes del protocolo SHIRPA según Lackner *et al*⁵⁹.

Prueba	Escala de puntos
Conducta de transferencia	0: coma (no se mueve, generalmente descansa de lado). 1: poco movimiento, se queda en el cuadrado original. 2: poco movimiento, sale del cuadrado original después de 15 segundos. 3: movimiento limitado, sale del cuadrado original después de 10 segundos. 4: movimiento más lento que lo normal, pues sale del cuadrado después de 5 segundos. 5: movimiento normal, comienza a desplazarse inmediatamente después de la transferencia.
Actividad locomotora (30 segundos)	0: 0 cuadrados 1: 1-3 cuadrados 2: 4-8 cuadrados 3: 9-15 cuadrados 4: > 15 cuadrados
Tono abdominal	0: flácido. 1: ligera resistencia.
Maniobra en alambre	0: cae inmediatamente 1: se sostiene y cae en 5 segundos 2: se sostiene y cae entre 5 y 20 segundos 3: se sostiene por más de 20 segundos y cae, o presenta dificultad para erguir las patas traseras. 4: agarre inmediato con las patas traseras.
Irritabilidad	0: no lucha 1: lucha durante sujeción supina
Reflejo postural en arena	0: incapaz de enderezarse (descansa de lado) 1: demora en enderezarse 2: poco tiempo para enderezarse 3: adopta inmediatamente la postura correcta

2.3.4.- Análisis histopatológico de los encéfalos de animales infectados y controles.

Animales controles sanos (n=4) e infectados con enfermedad terminal en los cuales se observaron signos neurológicos (n=5) fueron sacrificados por dislocación cervical y se colectaron cuidadosamente los encéfalos que fueron colocados en formalina al 10% en buffer fosfato salino. Posteriormente, cada encéfalo se separó en 4 secciones coronales que fueron procesadas por el método de imbibición en parafina mediante el procesador automático (Sakura, Japón), cortadas a 5 µm con un micrótopo rotatorio vertical (Leica, Alemania) y las láminas se colorearon posteriormente con hematoxilina-eosina. Todos los cortes de cada animal fueron examinados con un microscopio Zeiss (Karl Zeiss, Alemania) proveído con una cámara digital Power Shot G5 (Canon, Japón) y acoplado al programa procesador ZoomBrowser EX versión 1.0.

Para el análisis de la presencia de hemorragias se utilizó el método semicuantitativo descrito previamente por Dai *et al*⁷¹; basado en una escala de 0 a 4: 0 = los glóbulos rojos están confinados dentro de los vasos, 1 = se observa 1 vaso con una extravasación mínima de glóbulos rojos en un campo de amplificación objetivo 10x; 2 = más de 1 vaso con extravasación mínima en un campo microscópico, 3 = un vaso con extravasación extensa en un campo; 4 = más de 1 vaso con extensa extravasación en un campo. La presencia de microhemorragias se describió como un conjunto bien circunscrito de 10-100 glóbulos rojos en el parénquima, no confinados a un vaso sanguíneo. El daño vascular se verificó a una amplificación con objetivo 40X. Los cortes positivos fueron comparados con las coordenadas descritas en el atlas del encéfalo de ratón⁸⁹, en el cual el punto determinado por la intersección de las suturas coronal y sagital llamado bregma se tomó como referencia. Los resultados se elaboraron con la descripción de todos los campos 10x que presentaron hemorragias. Tres especialistas en Anatomía Patológica ajenos a las condiciones de las muestras revisaron las láminas.

2.4.- Análisis estadístico de los datos.

Los resultados de cada prueba en cada día de análisis y para cada animal en estudio se recogieron en archivo de MS-Excel. En correspondencia con el resultado final de supervivencia y signos neurológicos en el periodo de observación, los animales se clasificaron en 3 grupos: infectados con enfermedad terminal y/o signos neurológicos hasta el día 11 (S), infectados en estado previo al severo por 24 horas o más (EP), infectados que sobreviven sin signos neurológicos durante todo el tiempo de observación d5 – d18 (No S). Se compararon los resultados con el grupo de controles sanos (C). Para establecer los límites en los periodos de clasificación se tuvieron en cuenta los resultados de investigaciones previas^{25, 90}.

El análisis estadístico se realizó mediante pruebas estadísticas no paramétricas. Los resultados de la parasitemia y el peso se analizaron por la prueba de Kruskal Wallis. Las tendencias centrales se estimaron como medianas y se expresaron los valores mínimos y máximos alcanzados. Las variables cualitativas ordinales y nominales se expresaron como porcentajes a los cuales se les aplicó la comparación de proporciones. Se utilizaron curvas de Kaplan-Meier para evaluar el perfil de supervivencia de los animales infectados. Se emplearon los programas estadísticos GraphPad Prism 5.0 y Epidat 3.0. Valores de p menores que 0,05 se consideraron como estadísticamente significativos.

2.5.- Consideraciones éticas.

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a los lineamientos internacionales para el cuidado de los animales en la experimentación biomédica⁹¹ y a la Resolución 11-2013 del CECMED que puso en vigor la Regulación 64-2012 “Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los Comités Institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL)”⁷⁹.

La aplicación de PFH se realizó conforme a estos lineamientos que señalan los signos clínicos y condiciones del animal que requieren urgente acción por las personas encargadas del estudio. El responsable de la aplicación del PFH fue el

médico veterinario, en este caso, el autor de la tesis. Además, implicó la participación de cuidadores, técnicos en veterinaria e investigadores del equipo de investigación. El método seleccionado para aplicar PFH fue la dislocación cervical. No se utilizó anestesia ni otros fármacos ya que podían interferir con los objetivos del estudio.

Se siguieron las recomendaciones para el volumen de inyección intraperitoneal, el diámetro de la aguja, la toma de sangre frecuente sólo por flebotomía de la cola y volumen mínimo. Para la identificación de los animales se utilizó el método de muescas en el borde de las orejas el cual produce un estrés de corta duración, pero las consecuencias posibles son de menor daño que en el caso de técnicas más modernas⁹².

Se consultó abundante bibliografía que justifica el uso de este modelo animal ya que se pueden obtener resultados de relevancia para el tratamiento de la enfermedad en humanos.

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS

3.1- Características clínicas de la malaria experimental producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka. Determinación de indicadores apropiados para el PFH en este modelo.

Las condiciones físicas de los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka se deterioraron entre los días 6 y 11 post-infección, se produjeron muertes espontáneas de los animales y se aplicó PFH según los criterios acordados para su aplicación urgente. En este periodo 81,25% del total de infectados no sobrevivieron. Estos animales se consideraron con enfermedad severa (grupo S). La mediana de supervivencia fue 6 días (figura 1). La proporción de animales del grupo S en condiciones comparables al grupo de animales controles sanos fue significativamente menor (19% y 0% en los días 6 y 7) desde el punto de vista estadístico (tabla 1). La puntuación en la escala de signos clínicos relacionados con estado severo mostró medianas de 2 y 2,5 puntos, en los días 6 y 7 del grupo S, respectivamente. La observación de signos severos se correspondió con la aplicación del PFH para 52,6% del total de animales del grupo S (2-3 puntos), mientras las muertes naturales o espontáneas se produjeron para 18,4% que se observó encorvamiento (1 punto), 21% (la última puntuación registrada fue 0) y 7,9 % que no se recogieron datos 24 horas antes de la muerte.

Los ratones en que se aplicó PFH por la observación de signos severos mostraron afectaciones neurológicas (dificultad en la marcha, parálisis de las extremidades posteriores y de la región del cuello y convulsiones) en 40% de los casos y dificultad respiratoria en 65%. Las convulsiones se presentaron en diferentes formas y en la forma mixta se observó frecuentemente aquella en la que el animal bocarriba, intenta ponerse de pie y rueda de un costado para otro o hacia el mismo lado. No se observó comportamiento estereotipado en ningún grupo de estudio.

Estos signos se desarrollaron muy rápidamente, pues la proporción de ratones observados en las 24 horas previas (EP) que no mostraron este tipo de afectación no fue significativamente diferente de la del grupo control sano (tabla1)

Un 18,75% de los ratones infectados no presentaron signos neurológicos entre los días 6 y 11 y mantuvieron la supervivencia después del día 12 post-infección (grupo No S, figura 1, tabla 1). En este grupo No S se redujo significativamente la proporción de animales en condiciones comparables al grupo de animales sanos a partir del día 12, en que aparece encorvamiento (tabla 1).

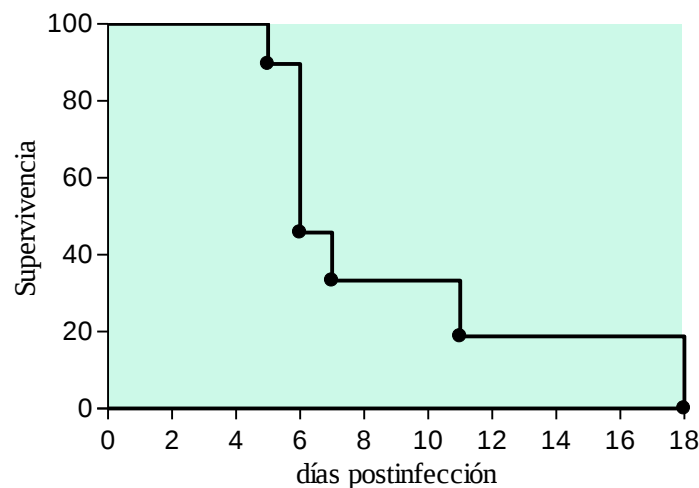


Figura 1. Supervivencia total de los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka según análisis de Kaplan-Meier.

Tabla 1. Resultados de las observaciones relacionadas con la severidad de la enfermedad producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka, según escala de puntuación de Waknine-Grinberg et al⁶⁴.

Grupo	n	Día 5	n	Día 6	n	Día 7	n	Día 11	n	Día 12
a- C	10	0 [¶] (0/0) [†] 100%							10	0 (0/0) 100%
b- S	5	0 (0/3) 80%	21	2 (0/3) 19%	6	2.5 (1/3) 0%	2	(3/3)	-	-
				*a-p<0,001		a-p<0,001				
c- EP	33	0 (0/1) 97%	12	0 (0/1) 92,3%	6	0 (0/1) 85,7%	-	-	-	-
d- No S	9	0 (0/0) 100%	9	0 (0/0) 100%	9	0 (0/0) 100%	ND	ND	15	0 (0/1) 53,3% a-p<0,05

Se presentan las medianas[¶] de la puntuación, (valores mínimos y máximos)[†] y la comparación de los porcentajes de animales de cada grupo que fueron evaluados sin alteraciones aparentes*. ND- no se aportaron datos.

En los días 6 y 7 de este estudio, es significativa la disminución de la proporción de animales del grupo S en los que su apariencia externa es normal (14,3% y 0%, en el mismo orden) al comparar con controles sanos, ya que la mayoría presentaron piloerección y las puntuaciones mostraron medianas de 2 y 1,5 puntos en la escala, respectivamente (tabla 2). La observación de piloerección y pérdida del acicalamiento se adicionó a las evidencias de la acción urgente sobre los animales del grupo S. Esta afectación se desarrolló muy rápidamente, pues la proporción de ratones observados en las 24 horas previas (EP) que no mostraron piloerección no fue significativamente diferente del grupo de controles sanos (tabla 2). En el grupo No S, solamente se observaron alteraciones a partir

del día 12 en el cual se mostró una proporción significativamente menor (26,6%) de animales en condiciones similares al grupo control (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las observaciones relacionadas con la apariencia de ratones C57BL/6/Cenp por la infección con *P. berghei* Anka, según escala de puntuación de Waknine-Grinberg *et al*⁶⁴.

Grupo	n	Día 5	n	Día 6	n	Día 7	n	Día 11	n	Día 12
a- C	10	0 [¶] (0/0) [†] 100%							10	0 (0/0) 100%
b- S	5	0 (0/2) 60%	21	2 (0/2) 14,3% *a-p<0,001	6	1.5 (1/2) 0% a-p<0,001	2	(2/2)	-	-
c- EP	33	0 (0/2) 94,11%	12	0 (0/2) 91,6%	6	0 (0/1) 85,7%	-	-	-	-
d- No S	9	0 (0/0) 100%	9	0 (0/0) 100%	9	0 (0/1) 88,8%	-	ND	15	1 (0/2) 26,6% a-p<0,01

Se presentan las medianas[¶] de la puntuación, (valores mínimos y máximos)[†] y la comparación de los porcentajes de animales de cada grupo* que fueron evaluados sin alteraciones aparentes.

Se determinó la reducción del peso corporal de los animales del grupo S con medianas 3,7%, 9,9% y 8,2%, en los días 5, 6 y 7 de este estudio, respectivamente, que resultaron diferentes desde el punto de vista estadístico al comparar con las medianas de controles sanos (el grupo control no presentó diferencias significativas en el peso en diferentes días del estudio, aunque se mostró un incremento de 9,4% para el día18); con las de los animales del grupo EP y del grupo No S. La reducción del peso en el grupo S mostró niveles inferiores al establecido para la aplicación de PFH (mayor del 15 % o pérdida gradual continua). Los grupos EP y No S presentaron como tendencias centrales la no

pérdida de peso en los días 5, 6 y 7. En el grupo No S, no se observaron alteraciones significativas del peso el día 12 (tabla 3).

Tabla 3. Resultados de las determinaciones del descenso del peso corporal producido por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka.

Grupo	n	Día 5	n	Día 6	n	Día 7	n	Día 11	n	Día 12
a- C	10	0 (0/0)							10	0 (0/0)
b- S	5	3,7 (2,7/5,6) a-p<0,01 d- p<0,01	21	9,9 (4,4/14,1) a-p<0,001 c-p<0,001 d-p<0,001	6	8,2 (3,0/19,5) a-p<0,001 c-p<0,01 d-p<0,05	2	11,1	-	-
c- EP	33	0 (0/6,3)	12	0 (0/11,0)	6	0 (0/2,1)	-	-	-	-
d- No S	9	0 (0/1,9)	9	0 (0/7,2)	9	0 (0/11,6)	ND	ND	15	3,0 (0/33)

Se presentan las medianas[†] (valores mínimos y máximos)[†] que se compararon por la prueba de Kruskal-Wallis y prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunn*.

En el grupo S, en los días 5, 6 y 7, es significativa la menor proporción de animales del grupo S (0%) que presentaron temperaturas en los límites normales al comparar con controles sanos. El grupo control no mostró diferencias en la temperatura (mediana de 37,1 (36,3/37,8) °C) en diferentes días del estudio. El grupo S presentó mediana de 2 puntos lo cual corresponde a una disminución de la temperatura por debajo de 35 °C (tabla 4). Esto indicó la posibilidad de progresar a la hipotermia, señal de afectación del bienestar que requiere PFH. La proporción de ratones observados en las 24 horas previas (EP) que no mostraron alguna afectación de la temperatura no fue significativamente diferente del control sano (tabla 4). En el grupo No S, solamente se observan alteraciones a partir del

día 12 ya que se mostró una proporción de animales en condiciones comparables al grupo de animales sanos significativamente menor (46,6%). La mediana fue 1 punto, por lo que no se evidenció estado severo (tabla 4).

Tabla 4. Resultados de las observaciones relacionadas con la disminución de la temperatura de los animales producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka, según escala de puntuación de Waknine-Grinberg *et al*⁶⁴.

Grupo	n	Día 5	n	Día 6	n	Día 7	n	Día 11	n	Día 12
a- C	10	0 (0/0) 100%*							10	0 (0/0) 100%
a- S	5	2 (2/2) 0% a-p<0,001	21	2 (2/2) 0% a-p<0,001	6	2 (2/2) 0% a-p<0,001	2	2 (2/2)	-	-
b- EP	33	0 (0/2) 94,1%	12	0 (0/2) 84,6%	6	0 (0/1) 85,7%	-	-	-	-
c- No S	9	0 (0/0) 100%	9	0 (0/1) 88,8%	9	0 (0/0) 100%	ND	ND	15	1 (0/2) 46,6% a-p<0,05

Se presentan las medianas[¶] de la puntuación, (valores mínimos y máximos)[†] y la comparación de los porcentajes de animales de cada grupo que fueron evaluados sin alteraciones aparentes*. ND- no determinado.

Los resultados de la parasitemia se muestran en la tabla 5. El grupo S presentó medianas de la parasitemia de 13,7%, 23,5% y 24,6%, en los días 5, 6 y 7 respectivamente. Estos valores fueron inferiores al establecido para la aplicación de PFH (>50%). El grupo de los animales en proceso de desarrollar estado severo en el día 5 presentó una mediana de 7,2%, lo cual representa una diferencia muy significativa estadísticamente con el grupo No S. En el grupo No S, solamente se observó incremento significativo de la parasitemia a partir del día 12.

Tabla 5. Resultados de la parasitemia (%) producida por la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka.

Grupo	n	Día 5	n	Día 6	n	Día 7	n	Día 11	n	Día 12
a- S	5	13,7 (10,1/20) c- p<0,001	16	23,5 (11,7/39,1) c-p<0,001	6	24,6 (13,5/43,8) c-p<0,001	2	- (17,2/19,2)	-	-
b- EP	31	7,2 (0,5/19,7) c- p<0,001		ND	6	3,3 (0,08/9)	-	-	-	-
c- No S	9	0 (0/0,08)	5	0,31 (0/0,8)	9	0,8 (0/5,3)	ND		15	14,9 (9/51,6)

Se presentan las medianas[†] (valores mínimos y máximos)[†] que se compararon por la prueba de Kruskal-Wallis y prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunn*.

En el seguimiento de los animales del grupo No S se observó mayor deterioro hacia el día 18. Aunque no se observaron signos neurológicos, se observó mayor piloerección y pérdida del acicalamiento, el peso corporal descendió 23,8 (10,9/29,4) % lo cual dificultó la medición de la temperatura rectal en estos animales y la parasitemia se incrementó a valores de 56 (50,3/62,5) %, por lo que se evidenció la necesidad de aplicación de PFH como se mostró en la figura 1.

3.2- Resultados de las observaciones conductuales adicionales mediante pruebas de los reflejos, estado nervioso, funciones motoras y sensoriales.

Se determinaron los porcentajes de animales en cada grupo con puntuaciones máximas, según la escala de Lackner *et al*⁵⁹, al aplicar cada prueba adicional (Tabla 6). El grupo control mantuvo un 100 % de respuestas con puntuación máxima en la mayoría de las pruebas realizadas a los animales desde el día 0 hasta el día 18, excepto en la conducta de transferencia. En el grupo S, las proporciones de animales con puntuación normal fue diferente del grupo control sano para las pruebas de la conducta de transferencia ($p < 0,01$), la actividad locomotora ($p < 0,0001$), la maniobra en alambre ($p < 0,0001$) y la irritabilidad ($p < 0,05$). No se observó una respuesta normal al examen del tono abdominal ($p < 0,01$) en el grupo S. No se detectaron cambios significativos en la prueba del reflejo postural. Los infectados en proceso de desarrollar signos neurológicos (EP) mostraron una proporción de animales con puntuaciones óptimas de actividad locomotora significativamente menor ($p < 0,01$). El grupo No S, hasta el día 7, también presentó una proporción de animales con puntuaciones óptimas de actividad locomotora significativamente menor ($p < 0,05$).

La descripción del perfil conductual de los individuos de cada grupo en las pruebas mencionadas se muestra en la figura 2. La conducta de transferencia en el grupo S presentó valores de mediana 4, 2, 2 y 0 en los días 5, 6, 7 y 11 del estudio, respectivamente (Figura 2a). En paralelo, la actividad locomotora disminuyó hasta valores de mediana 2, 1; 0,5 y 0 correspondientes a los días 5, 6, 7 y 11 del estudio, mientras los que se encontraron en estado de progreso (EP) y los del grupo No S resultaron afectados aunque con medianas de puntuación 3 (Figura 2b). La maniobra en alambre es una conducta que solamente se afectó en el grupo S (Tabla 6), presentó valores de mediana de 2, 1; 0,5 y 0 en los días 5, 6, 7 y 11 del estudio, respectivamente (Figura 2c).

Tabla 6. Resultados de la frecuencia total de animales que mantienen las puntuaciones máximas en las pruebas adicionales para los grupos: Control, EP, S y No S (hasta día 7).

Grupos de estudio	n	Evaluaciones con la máxima puntuación											
		Conducta de transferencia		Actividad locomotora		Maniobra en alambre		Tono abdominal		Irritabilidad		Reflejo postural	
		%	p	%	p	%	p	%	p	%	p	%	p
Control	10	80	-	100	-	100	-	100	-	100	-	100	-
EP	28	93,7	0,5	39,3	0,003	78,6	0,27	92,8	0,96	100	-	100	-
S	32	28,1	0,010	0	0,000	18,7	0,000	46,9	0,008	52,1	0,02	71,8	0,14
No S (d7)	9	100	0,5	44,4	0,026	77,8	0,40	100	-	100	-	100	-

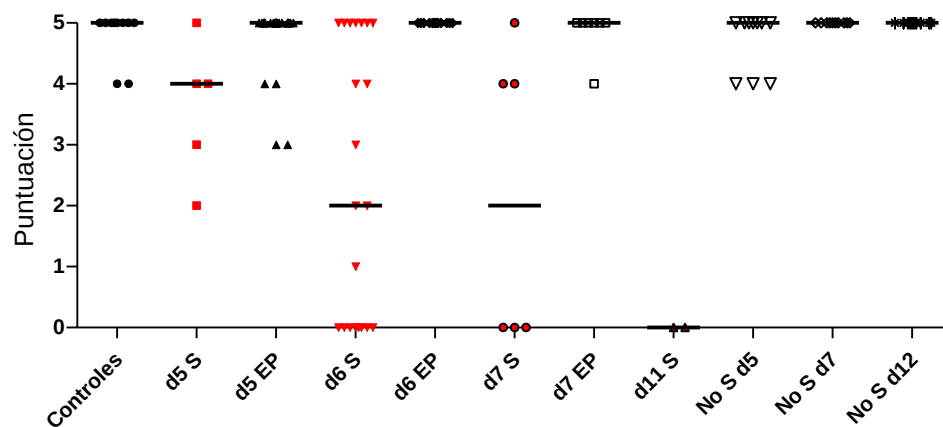


Figura 2a. Distribución de los valores individuales y medianas de las puntuaciones de la conducta de transferencia de los animales en los grupos: Control, EP, S y No S (días 5, 7 y 12).

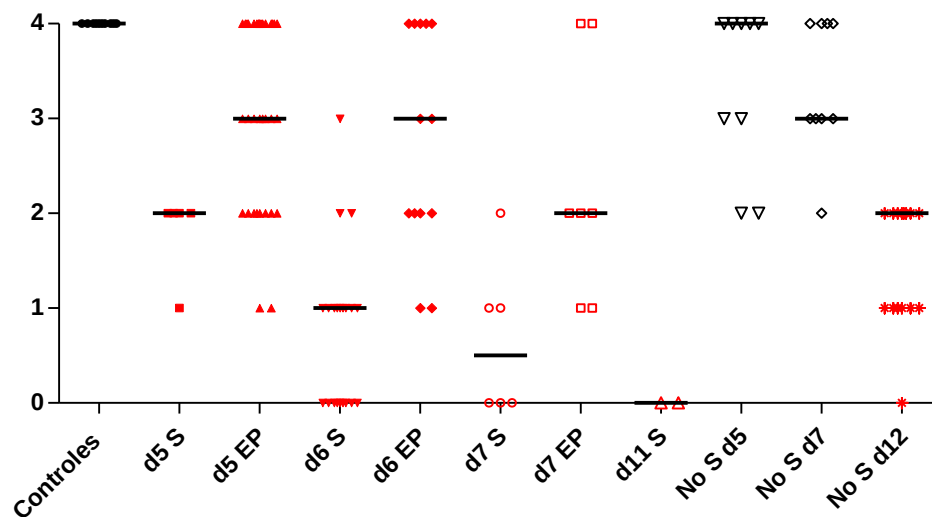
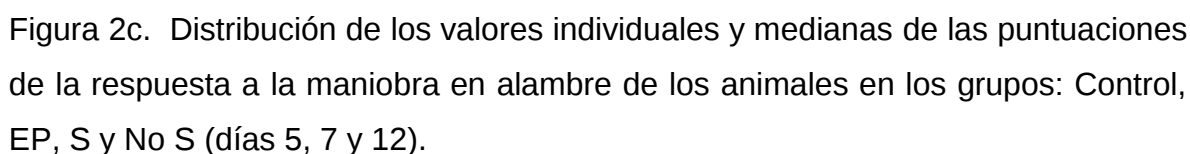


Figura 2b. Distribución de los valores individuales y medianas de las puntuaciones de la respuesta de actividad locomotora de los animales en los grupos: Control, EP, S y No S (días 5, 7 y 12).



Los cuatro encéfalos de ratones C57BL/6 Cenp sanos no presentaron alteraciones de su histomorfología. Solamente se encontraron algunos artefactos de edema vascular debido al no empleo de la técnica de perfusión al sacrificio (Figura 3). En la tabla 7 podemos observar que contrario al caso de la muestra 1 en la cual solamente se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio localizado en la sección bregma- 0 a +0,2, el principal hallazgo histológico en las muestras de encéfalos de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka que presentaron signos neurológicos fueron las hemorragias. La figura 4 muestra una de las microhemorragias detectadas en la muestra 2 (tabla 7), mientras en las otras muestras predominó la presencia de vasos con extravasación extensa de eritrocitos (figura 5, figura 6, tabla 7). Estas alteraciones se presentaron en más de un corte coronal de cada animal y se localizaron fundamentalmente en la parte

anterior del encéfalo de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas. Las afectaciones hemorrágicas se identificaron a nivel de la corteza en las muestras 2, 3 y 5. También se observaron vasos congestionados con glóbulos rojos y leucocitos asociados o no al mismo corte coronal donde aparecieron las hemorragias (figura 6). Se observaron otras características histomorfológicas en encéfalos de animales del grupo S que deben analizarse posteriormente.

Tabla 7. Análisis semicuantitativo de las hemorragias observadas en las secciones de tejidos encefálicos de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka que presentaron signos neurológicos.

Muestra	Análisis semicuantitativo de las hemorragias	Localización con referencia al punto bregma
1	0	-
2	1	+2 a +2,68
	1	0 a +0,2
3	3	-
4	2	-
	3	-
	3	-
	3	-
5	3	0 a +0,2
	3	-1,3 a -1,4

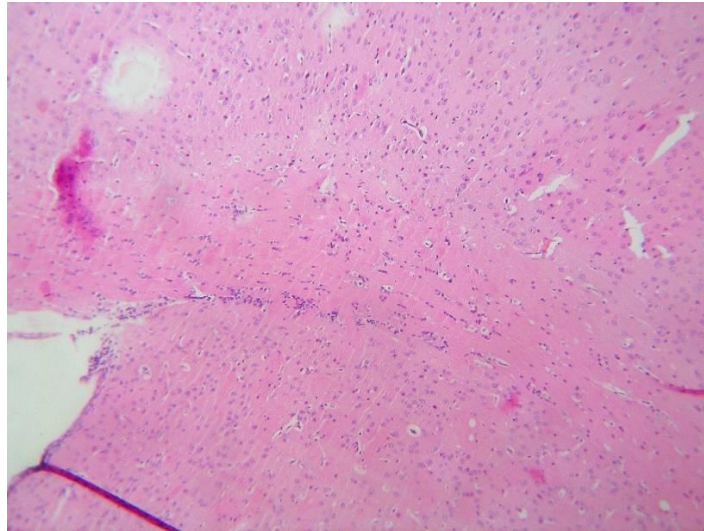


Figura 3. Histomorfología normal de corte de encéfalo de animal no infectado. Amplificación 100x.

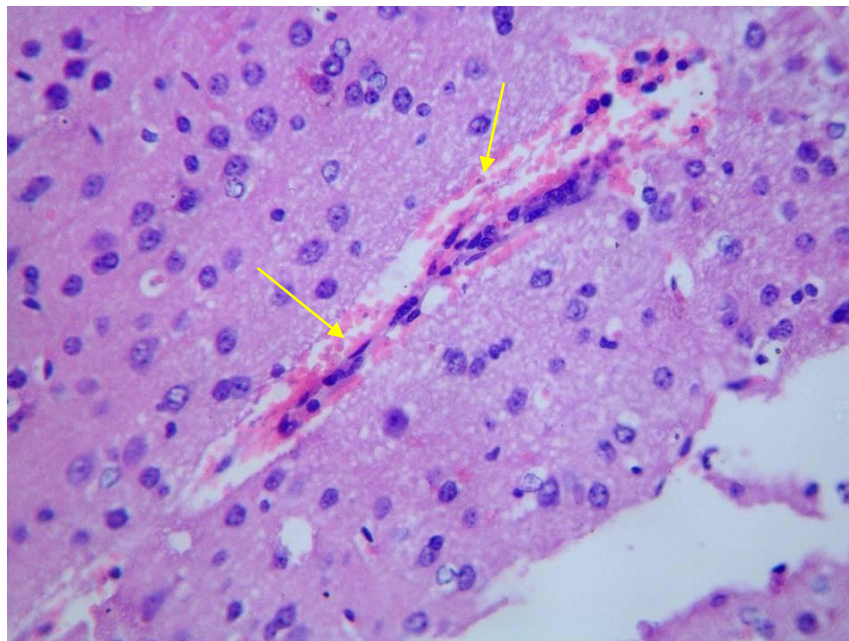


Figura 4. Observación de área de microhemorragia en encéfalo de un animal del grupo S (muestra 2). Amplificación 400x.

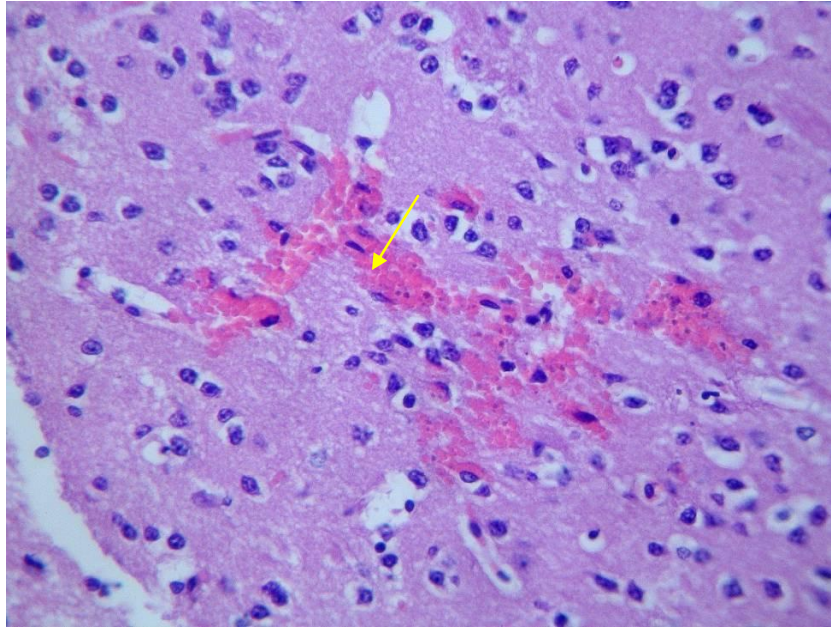


Figura 5. Observación de un foco hemorrágico en un animal del grupo S (muestra 4). Amplificación 400x.

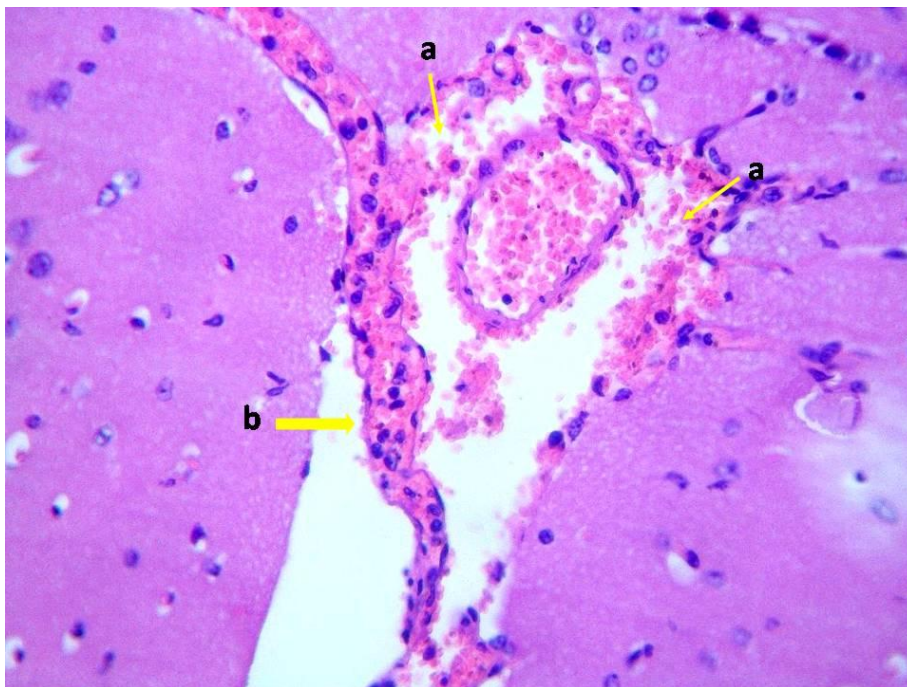


Figura 6. Observación de un foco hemorrágico (a) y vaso sanguíneo taponado con eritrocitos y acumulación de leucocitos (b), en un animal del grupo S (muestra 5). Amplificación 400x.

Capítulo 4.- DISCUSIÓN

La infección con estados eritrocíticos de parásitos del género *Plasmodium* causa una patología multiorgánica que varía de órgano a órgano en dependencia de la combinación hospedero-especie de *Plasmodium*. Esto es particularmente visible en modelos de malaria de roedores, en los cuales diferentes cepas de ratones, infectados con diferentes especies y cepas de *Plasmodium*, desarrollan patologías disímiles tanto auto-limitadas como fatales^{21, 93}. La infección de los ratones de las cepas C57BL/6 y CBA con *P. berghei* Anka produce encefalopatías fatales¹⁸, las cuales se distinguen de las patologías de distintos modelos que representan otros aspectos de la malaria severa en humanos tales como la anemia, el daño pulmonar agudo y la malaria asociada al embarazo⁹³⁻⁹⁵.

La ficha de supervisión implementada en este estudio aportó datos de la observación diaria de los animales que afirman la presencia de signos neurológicos en los ratones de la sublínea C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka que se presentaron en estado terminal entre los días 6 y 11 del estudio. Los signos neurológicos que se comprobaron fueron la ataxia, la parálisis límica y las convulsiones, los cuales aparecen registrados frecuentemente en estudios previos^{72, 93, 96}. La manifestación de coma se describe también en múltiples investigaciones sobre MCE, aunque su estimación en este modelo no está sujeta a un protocolo estandarizado⁵⁹. Debido a su difícil diagnóstico, no se incluyó entre las observaciones realizadas.

La presencia de convulsiones y sus características son aspectos importantes a definir en la reproducibilidad del modelo debido a que este signo neurológico es una situación común a la malaria cerebral en niños (casi un 80% ingresan por esta causa) y también se presenta como afectación neurológica en los adultos aunque es menos frecuente^{97, 98}. Las convulsiones tanto en pacientes pediátricos como adultos son usualmente tónico-clónicas generalizadas, mientras las convulsiones focales no son frecuentes y el estado epiléptico es muy raro^{97, 98}. Se considera que el daño causado a las neuronas por la presencia de áreas de perfusión reducida (hipoxia /isquemia) puede producir una alteración fisiológica que conduce a la actividad convulsiva; esta a su vez, puede empeorar este daño si

se prolonga⁹⁷. La dificultad en el aprendizaje es una de las secuelas de la infección severa por *P. falciparum* que se ha determinado que está asociada a factores de riesgo tales como la hipoglicemia, las convulsiones, la profundidad y duración del coma y la hiporespuesta a los reflejos, principalmente en niños⁹⁹⁻¹⁰¹. Los estudios de seguimiento en adultos han sido escasos⁹⁸.

La ficha de supervisión implementada en este estudio recogió las observaciones de convulsiones tónicas, clónicas y mixtas en los ratones de la sublínea C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka. Aunque las investigaciones precedentes sobre el modelo MCE tienen poca información sobre las características de estas afectaciones neurológicas, las observaciones de este estudio concuerdan con estudios recientes de MCE que informan del predominio de las convulsiones tónico-clónicas, en el contexto de evaluaciones realizadas con mayor precisión debido a la utilización de la video-electro-encefalografía¹⁰².

Se requieren estudios prospectivos en pacientes para investigar con mayor claridad los eventos que constituyen secuelas del padecimiento de esta forma severa de la enfermedad, examinar su patogenia y realizar estudios terapéuticos⁹⁷, por lo que profundizar en las características de los modelos animales puede ser de gran ayuda.

También se observó respiración anormal en el grupo S lo cual sugiere la afectación independiente de las funciones del encéfalo y de los pulmones, así como una posible relación patológica entre ambos órganos. Se considera que la patología pulmonar de los ratones C57BL/6 infectados con *P. berghei* Anka es moderada. Las características histológicas fundamentales que se han descrito en la mayoría de los casos son la presencia discreta de células inflamatorias mononucleares y/o leucocitos polimorfonucleares sin engrosamiento de los tabiques alveolares. Debido a estos resultados, Epiphonio *et al*⁹³ consideran que la patología pulmonar no se presentó con la severidad suficiente para constituir la causa de muerte, si se compara con la exudación pleural, edema pulmonar y hemorragias producidas en un modelo murino representativo de daño pulmonar agudo (DBA/2 infectados con *P. berghei* Anka). Otros autores opinan que la patología pulmonar se desarrolla paralelamente a la MCE (*P. berghei* Anka-

C57BL/6), con edema, infiltración intersticial de células inflamatorias y hemorragias limitadas, pero el carácter fulminante de la MCE evita que la patología pulmonar se desarrolle completamente⁵². Lackner *et al*⁵⁹ también detectaron una afectación en el ritmo respiratorio de los animales con signos neurológicos. Estos autores consideraron que podía deberse al secuestro de parásitos en vasos pulmonares, que se observa tanto en modelos murinos⁵², como en pacientes⁴⁷ y puede deberse a afectaciones en el centro regulador de la respiración en el sistema nervioso central (SNC) ya que el examen histológico mostró la presencia de alteraciones en el tallo cerebral en la MCE⁵⁹. Resultados recientes sugieren que en pacientes pediátricos la respiración falla centralmente, más que a consecuencia de una lesión anatómica del pulmón^{47, 103}. Ya que la taquipnea descrita en pacientes pediátricos puede tener causas diferentes como la fiebre, la acidosis metabólica y el daño pulmonar¹⁰⁴, se requiere continuar el estudio de la dificultad respiratoria en este modelo murino, para lo cual se ha recomendado recientemente el empleo de técnicas fisiológicas, anatómicas e histológicas⁵².

La observación de piloerección está dirigida a valorar el dolor y molestias producidas a los ratones de laboratorio. Se recomienda en múltiples modelos ya que representa un indicador de salud y bienestar de estos animales⁸⁶. La observación de una piloerección fuerte en los ratones del grupo S es una evidencia adicional de las condiciones severas en que se encuentran estos animales producto de la infección parasitaria. En forma similar, se presentaron cambios significativos en el peso y la temperatura corporal en el grupo S, no observados en el grupo No S y EP. Lacerda-Queiroz *et al*¹⁰⁵ y Bucher *et al*¹⁰⁶ reportaron una marcada pérdida de peso entre 5 y 20% en los animales con MCE durante la infección. Es posible que las afectaciones neurológicas también reduzcan la capacidad de los ratones para obtener agua y alimentos⁸⁶. En roedores, una ingesta inadecuada de comida puede desembocar en una termorregulación deficiente y en una baja temperatura corporal^{84, 107}. Este descenso ha sido utilizado como un marcador de muerte inminente en muchos campos de la investigación *in vivo*, su persistencia es un signo clínico severo que

necesita intervención inmediata¹⁰⁸. En la isquemia-hipoxia inducida por lipopolisacáridos (LPS) en neonatos de rata ocurre hipotermia. En este caso, los autores consideraron que podría valorarse como un efecto físico general, una respuesta que precede a la fiebre, pero además podría ser una acción neuroprotectora en respuesta a la encefalopatía¹⁰⁹.

El grupo S presentó un aumento progresivo de la parasitemia desde el día 5, que mostró una mediana de 7,2% en estado previo de la presentación de signos severos, lo cual representó una diferencia muy significativa estadísticamente con el grupo No S. Algunos autores han encontrado valores de parasitemia menores o iguales que 10% en el grupo de animales con MCE y conjuntamente, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ratones con y sin signos neurológicos^{59, 65, 110}. Sin embargo, estudios similares señalan valores de parasitemia superiores a 6-7% en los días 6 y 7 como característica de los ratones en el curso de la MCE^{71, 106}; con una correlación negativa entre la temperatura y la parasitemia¹⁰⁶, la ausencia de afectaciones en los niveles de hemoglobina y hematocrito¹⁰⁶ y una asociación significativa entre el riesgo de desarrollar MCE y la parasitemia²⁵. En estas investigaciones la parasitemia aumentó progresivamente en los ratones con MCE hasta alcanzar valores entre 25 y 30% en los días 6 y 7 que fueron significativamente más altos que en ratones sin signos neurológicos^{25, 105}. En resumen, de forma similar a los antecedentes, este estudio apunta hacia la importancia del curso de la parasitemia como indicador del progreso de la severidad entre los días 6 y 11 de la infección.

Varios laboratorios internacionales consideran que las evaluaciones conductuales estandarizadas son herramientas de gran valor para los estudios genéticos en ratones¹¹¹. Sin embargo, el fenotipaje conductual ha ganado tantos adeptos como detractores en el campo de estudio de las neurociencias. Esto se debe a que las pruebas conductuales son altamente sensibles a variables experimentales y ambientales que pueden afectar la replicación de los resultados de las evaluaciones de cada línea consanguínea de ratón entre diferentes laboratorios^{112, 113}. Esto ha motivado la realización de estudios experimentales de validación cruzada para investigar la robustez de los protocolos existentes.

Mandillo *et al*¹¹⁴ demostraron que la mayoría de los parámetros registrados en el protocolo SHIRPA tuvieron pocas diferencias en las observaciones de los laboratorios participantes en el estudio, lo cual fundamenta la aplicación de este tipo de pruebas en esta investigación en la cual se caracterizaron los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka. Las puntuaciones obtenidas con los controles sanos en este estudio fueron las esperadas en correspondencia con investigaciones precedentes^{59, 114}.

Un gran número de diferencias en los signos clínicos y en las pruebas conductuales según el protocolo SHIRPA fueron observadas en los estudios de Lackner *et al*⁵⁹ entre los animales que mueren con signos neurológicos y los infectados sin signos neurológicos. En este trabajo se determinó la importancia de las evaluaciones realizadas mediante las pruebas de conducta de transferencia, actividad locomotora, maniobra en alambre, tono abdominal e irritabilidad en el grupo S. Estos resultados obtenidos con los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka permiten afirmar aquellos de investigaciones precedentes las cuales describen un deterioro progresivo de las funciones autónomas, el estado nervioso, la conducta motora, la fuerza y el tono muscular en el grupo sintomático severo^{96, 110, 114}. Evidencias actuales sugieren su relación con afectaciones neurológicas: en primer lugar por la demostración post-mortem de enfermedad encefálica⁵⁹, en segundo lugar debido a que los eventos inflamatorios en el SNC se mostraron asociados a los cambios conductuales¹⁰⁵, tercero que las afectaciones en las pruebas motoras se relacionaron con los datos obtenidos en modelos de choque isquémico¹¹⁶.

Las principales diferencias con estudios previos se encontraron en relación a la determinación de las pruebas indicadoras tempranas de afectaciones en el curso de la infección. Investigaciones anteriores plantean que la conducta motora y el estado sensorial y nervioso se afectan anticipadamente en la MCE^{25, 59}. En este estudio, el grupo EP solamente mostró diferencias significativas con el grupo control en relación a su actividad locomotora. Sin embargo, sería necesario incorporar otras pruebas que contribuyen a la valoración del estado nervioso para

re-evaluar la posibilidad de incorporarlas a la detección del progreso individual a la enfermedad con signos neurológicos.

En las investigaciones de Lackner *et al*⁵⁹ y Martins *et al*²⁵ se determinaron diferencias estadísticamente significativas en varias pruebas conductuales entre infectados que no desarrollaron signos clínicos en el periodo crítico y controles sanos. Los resultados de este estudio solamente señalan afectaciones significativas en el periodo crítico en relación a la actividad locomotora del grupo No S frente a los controles sanos, destacándose además que las diferencias de las medianas de los valores de puntuación fueron más marcadas entre el grupo S y controles. Lackner *et al*⁵⁹ consideraron estos cambios conductuales como debilidad general provocada por la infección, mientras Martins *et al*²⁵ y Carvalho *et al*¹¹⁷ sugieren que estos animales sufren algún grado de afectación neurológica que no progresa, por lo que es posible distinguir entre el grupo S y No S (que evoluciona lentamente hacia la hiperparasitemia).

El análisis del conjunto de los resultados de la ficha de supervisión nos permitió identificar a los animales en estado severo no solamente a partir de la aparición de signos neurológicos, además por el descenso en su temperatura, la piloerección y la reducción del peso corporal. La parasitemia se incrementó progresivamente, se mostró en los grupos EP y S por encima del 7%, de forma significativamente diferente al grupo No S. Las puntuaciones en las pruebas de actividad locomotora, la maniobra en alambre y la conducta de transferencia indicaron el progreso hacia el estado terminal, revelando que existe heterogeneidad en la velocidad de la respuesta de los individuos a la infección lo cual fue evidenciado por Carroll *et al*¹¹⁰. Con estos indicadores puede considerarse que los animales evaluados con puntuaciones diferentes a los controles seguramente progresarán en el sentido de la enfermedad severa con signos neurológicos y debe considerarse detener el proceso en cada animal para la aplicación de tratamientos o PFH.

La histopatología de la MCE ha sido estudiada en detalle. Para ello se han utilizado herramientas como la microscopía óptica^{59, 93, 118} y electrónica^{23, 60, 119}. La preparación previa de los animales se ha realizado a través de diferentes

alternativas de PFH entre las que predomina la aplicación de diferentes anestésicos^{71, 72, 110} y en algunos casos es seguida de perfusión intracardiaca con diferentes soluciones fisiológicas y fijadoras tales como Karnovsky, glutaraldehído 3% y paraformaldehído 4%^{23, 60, 72}. A pesar de la ausencia de un protocolo universal para realizar estos análisis, la característica histológica común en los tejidos encefálicos de los animales que presentaron convulsiones, parálisis límbica y coma, ha sido la presencia de microhemorragias y hemorragias más extensas^{71, 110, 120}. Análogamente, en este trabajo se encontraron estas evidencias del daño vascular en la mayoría de las muestras estudiadas de los animales con signos neurológicos.

Carvalho *et al*¹¹⁷ determinaron una mayor frecuencia de los focos hemorrágicos en animales con signos neurológicos. Los animales con puntuaciones mínimas en las pruebas funcionales y de conducta presentaron las áreas hemorrágicas mayores en las investigaciones de Lackner *et al*⁵⁹ y Carroll *et al*¹¹⁰. Además otras investigaciones sugieren que la distribución y localización del daño vascular durante la MCE es importante ya que los resultados obtenidos mostraron una correlación entre las áreas dañadas en la infección aguda y la mortalidad o la persistencia de las deficiencias motoras y cognitivas. Se destacaron las afectaciones observadas en el tallo encefálico que se pueden relacionar con el centro respiratorio, así como se plantea que los problemas de coordinación motora pudieran estar relacionados con la histomorfología detectada en el cerebelo y los defectos del aprendizaje se asociaron a incrementos significativos de la puntuación combinada de las hemorragias en la corteza, hipocampo y fornix⁷¹.

La mayoría de las afectaciones hemorrágicas en esta evaluación de la infección de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka se presentaron en la parte anterior del encéfalo, con frecuencia a nivel de la corteza. Esto indica similitud con otros estudios de MCE en que se encontraron múltiples focos hemorrágicos en la materia gris y blanca^{59, 93}. Recientemente, se describió que una de las primeras estructuras encefálicas afectadas por la infección con *P.*

berghei Anka es el bulbo olfatorio, lo cual representa una posibilidad de detectar tempranamente el desarrollo de la enfermedad neurológica en este modelo¹²¹.

Estudios postmortem de pacientes pediátricos describen la presencia de numerosas hemorragias petequiales ampliamente distribuidas en la materia blanca de los hemisferios cerebrales, en el tallo y en la materia blanca del cerebelo, comprendida la folia, mientras en la materia gris aparecieron muy raramente^{43, 47}. Sin embargo, existen diferencias visibles entre los encéfalos de humanos y de ratones. Estas diferencias no impiden la relevancia de infecciones murinas para modelar enfermedades en humanos debido a que se presentan regiones comparables y componentes básicos comunes aunque en los ratones descansan sobre un patrón más lineal¹²².

Uno de esos componentes comunes es la unidad neurovascular la cual está constituida de múltiples capas de componentes celulares y extracelulares que en su conjunto cumplen la función de barrera mediante procesos fisiológicos que proporcionan protección al endotelio y regulan el microambiente del encéfalo¹²³. Los diversos hallazgos derivados de estudios en humanos y modelos experimentales enfocan la génesis de la MC como una interrelación entre mecanismos de secuestro, inflamación y hemostasia que producen la desestabilización de la unidad neurovascular^{17, 124}.

La disminución de la integridad endotelial ha sido bien documentada en modelos murinos de malaria mediante la determinación de la salida del azul de Evans⁹³ y fibrinógeno¹²⁰ hacia el parénquima del encéfalo y a través de la determinación del efecto neurotóxico de la inyección de ácido fólico¹²⁵, entre otros ensayos. Se plantea que existen tres mecanismos fundamentales que incrementan la permeabilidad de la capa endotelial: 1) paso o tránsito paracelular, 2) paso a través de la célula y 3) paso producido por la muerte de la célula endotelial¹²³. La acción directa de los eritrocitos parasitados puede estar asociada a cambios en los niveles de expresión de las proteínas que forman parte de las uniones fuertes entre células endoteliales (occludina, zona occludens (ZO)-1, ZO-2 y claudin-5) las cuales forman una barrera encefálica efectiva para el flujo de fluidos. La pérdida de la fortaleza de estas uniones puede contribuir a la abertura

de la BHE bajo la acción de los daños isquémicos y la inflamación¹²³. Los linfocitos CD8⁺ específicos contra antígenos de *Plasmodium* tienen una importancia significativa en la patología vascular de la MCE ya que inician la activación de astrocitos, producen la alteración de las uniones entre células endoteliales y aumentan la permeabilidad vascular en un modo no-apoptótico^{126, 127}. Los linfocitos CD8⁺ utilizan la perforina para la ruptura de la BHE mediante un mecanismo que no es citolítico o citotóxico por lo que aún debe ser esclarecido¹²⁸. Además, la ruptura de estas uniones proteicas y de las proteínas estructurales de la lámina basal se plantea que se efectúa por la actividad de las metaloproteinasas de matrices¹²⁹. La permeabilidad endotelial se incrementa también por la muerte de estas células. La adhesión de eritrocitos parasitados es capaz de inducir apoptosis en células endoteliales *in vitro*¹²³.

En observaciones histológicas de encéfalos de animales afectados por la MCE, tanto por microscopía óptica como por electrónica, se ha descrito la presencia de ruptura de las paredes de los vasos acompañada de hemorragias, aunque en algunos casos los capilares están rodeados por eritrocitos y no se pudo detectar el daño a las paredes de estos conductos lo cual apunta a un quebrantamiento parcial de la barrera endotelial⁶⁰. En los casos fatales de niños y adultos, existen evidencias similares de la ruptura de las paredes de los vasos incluso necrosis capilar, daños a los cuales se asocian la trombosis intraluminal y/o las hemorragias en anillo¹²³. Este patrón establece dudas de si la formación de un pequeño trombo contribuye al daño inicial del vaso que da lugar a la microhemorragia o si el trombo se forma para cerrar el vaso afectado y detener el paso de eritrocitos hacia el parénquima⁴⁷.

Otras características histomorfológicas asociadas a encéfalos de animales con MCE deberán estudiarse posteriormente, tales como la presencia de edema, la activación glial y las afectaciones neuronales que han sido descritas en investigaciones precedentes^{23, 105, 119}.

Existen varias sublíneas de ratones C57BL/6 que están relacionadas, pero no son idénticas genéticamente y se han descrito diferencias conductuales entre ellas¹³⁰ (Zurita et al, 2011). Existen dos sublíneas principales de ratones C57BL/6,

conocidas como C57BL/6/J y C57BL/6/N de las cuales se derivaron las otras sublíneas por la distribución y propagación por varios investigadores y firmas comerciales¹³⁰. El número de polimorfismos entre sublíneas C57BL/6 es alto y se considera que pueden derivarse de la fijación al azar de nuevas mutaciones y la selección para heterocigocia residual. Se han descubierto variantes con número múltiple de copias entre sublíneas de ratones C57BL/6¹³¹, de modo que aunque externamente son muy similares, cada una de estas sublíneas es genéticamente distinta, en algunos casos las crías se han mantenido separadas por un largo tiempo, dando lugar a la acumulación de diferencias genéticas¹³⁰.

Es importante tener en cuenta las diferencias en el fondo genético de estas sublíneas ya que pueden conducir a heterogeneidad genética imprevista e introducir conclusiones erróneas en el análisis de los resultados comparativos de ratones modificados genéticamente y controles, también influye que hayan sido criados en diferentes ambientes. Un ejemplo de esto es que se determinaron diferencias en el perfil de expresión de proteínas de varias regiones encefálicas de ratones C57BL/6/J y C57BL/6/NCrI¹³¹. Otra esfera en que se reconoce la contribución de las diferencias genéticas del hospedero es en la inmunomodulación. Los genes que codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: *MHC*), citoquinas, receptores de éstas y receptores para el reconocimiento de patrones (del inglés: *Toll-like receptors* (TLRs), *Nod-like receptors* (NLRs)) pueden correlacionarse con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, en particular con la malaria severa, entre otros alelos. En estos estudios la descripción del origen y el fondo genético de los animales incorporados como modelos es esencial¹³².

Sin embargo, en un estudio reciente de varias sublíneas de ratones C57BL/6 mediante polimorfismos para un solo cambio de base se encontró que los animales de algunas sublíneas derivadas de C57BL/6/J presentaron el mismo genotipo¹³⁰. Aunque no contamos con la información sobre el genotipo de la sublínea C57BL/6/Cenp, los resultados obtenidos en esta investigación no difieren en forma general de los obtenidos previamente por otros autores que trabajaron con animales C57BL/6/J, criados en los laboratorios Jackson^{65, 72}, así como en los

laboratorios Charles River⁵⁹ o Janvier¹³³⁻¹³⁵, o con sublíneas derivadas (C57BL/6/JOlA-Hsd)⁶⁴. Este trabajo mostró que la infección de ratones C57BL/6/Cenp (derivada de los progenitores de los Laboratorios Janvier) con *P. berghei* Anka presentó las características clínicas y conductuales de una afección neurológica fatal en la mayoría de los infectados que se relacionaron con la presencia de cambios en la histomorfología de secciones del encéfalo. Conjuntamente, aportó los datos de evaluaciones conductuales mediante pruebas del protocolo SHIRPA de animales C57BL/6/Cenp sanos e infectados con *P.berghei* Anka no disponibles previamente.

CONCLUSIONES

- ✓ La mayoría de los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka mostraron estado terminal entre los días 6 y 11 de la infección, observándose signos de afectaciones neurológicas como parálisis límbica, convulsiones y ataxia.
- ✓ Se identificaron otros signos relevantes como la dificultad respiratoria, piloerección, descenso de la temperatura, reducción del peso corporal, así como el incremento de la parasitemia, los cuales caracterizaron la severidad de la infección parasitaria.
- ✓ Se determinó que los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka mostraron cambios conductuales en la actividad locomotora, maniobra en alambre, respuesta de transferencia e irritabilidad en el curso rápido al estado severo, lo cual incorporó evidencias de afectaciones neurológicas.
- ✓ Se determinaron los indicadores para la aplicación temprana de PFH, basados en los resultados de las evaluaciones conductuales y signos clínicos seleccionados.
- ✓ Se describió la presencia de microhemorragias y extravasación de eritrocitos más extensa en los tejidos encefálicos en correspondencia con la manifestación de signos de afectaciones neurológicas.

RECOMENDACIONES

- Emplear el modelo de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka en investigaciones posteriores con la ejecución de una ficha de supervisión basada en los resultados de este estudio.
- Continuar el estudio de la infección con *P. berghei* Anka de los ratones C57BL/6/Cenp en cuanto a la presencia de biomarcadores inflamatorios sistémicos y locales y su relación con la efectividad de intervenciones terapéuticas.
- Implementar métodos adecuados para aumentar las observaciones de los animales a intervalos más frecuentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Murray CJ, Ortblad KF, Guinovart C, Lim SS, Wolock TM, Roberts DA, *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014; 384: 1005-70.
- 2) Organización Mundial de la Salud. World Malaria Report 2013. Ginebra: WHO Press; 2013.
- 3) Arévalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, *et al.* Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta Trop*. 2012; 121: 303-14.
- 4) Anthony MP, Burrows JN, Duparc S, Moehrle JJ, Wells TN. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar J*. 2012; 11: 316.
- 5) Calleri G, Behrens RH, Schmid ML, Gobbi F, Grobusch MP, Castelli F, *et al.* Malaria chemoprophylaxis recommendations for immigrants to Europe, visiting relatives and friends - a Delphi method study. *Malar J*. 2011; 10: 137.
- 6) Askling HH, Bruneel F, Burchard G, Castelli F, Chiodini PL, Grobusch MP, *et al.* Management of imported malaria in Europe. *Malar J*. 2012, 11: 328.
- 7) Boggild AK, Geduld J, Libman M, Ward BJ, McCarthy AE, Doyle PW, *et al.* Travel-acquired infections and illnesses in Canadians: surveillance report from CanTravNet surveillance data, 2009-2011. *Open Med*. 2014; 8: e20-32.
- 8) Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Severe falciparum malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94: S1-S90.
- 9) Martins YC, Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: Lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16: 134-45.
- 10) Roca-Feltrer A, Carneiro I, Armstrong Schellenberg JR. Estimates of the burden of malaria morbidity in Africa in children under the age of 5 years. *Trop Med Int Health*. 2008; 13: 771-83.

- 11) Achidi EA, Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Mugri RN, Ngwai AN, Yafi CN. Severe and uncomplicated falciparum malaria in children from three regions and three ethnic groups in Cameroon: prospective study. *Malar J*. 2012; 11: 215.
- 12) Camara B, Diagne-Gueye NR, Faye PM, Fall ML, Ndiaye JL, Ba M, *et al*. Malaria severity criteria and prognostic factors among children in Dakar. *Med Mal Infect*. 2011; 41: 63-7.
- 13) Imani PD, Musoke P, Byarugaba J, Tumwine JK. Human immunodeficiency virus infection and cerebral malaria in children in Uganda: a case-control study. *BMC Pediatr*. 2011; 11: 5.
- 14) De Souza JB, Hafalla JCR, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010; 137: 755-72.
- 15) Fernando SD, Rodrigo C, Rajapakse S. The 'hidden' burden of malaria: cognitive impairment following infection. *Malar J* 2010; 9: 366.
- 16) Kariuki SM, Abubakar A, Newton CRJC, Kihara M. Impairment of executive function in Kenyan children exposed to severe falciparum malaria with neurological involvement. *Malar J* 2014; 13: 365.
- 17) Van der 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: 503-8.
- 18) White NJ, Turner GDH, Medana IM, Dondorp AM, Day NPJ. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*. 2009; 26:11-15
- 19) Shikani HJ, Freeman BD, Lisanti MP, Weiss LM, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Cerebral malaria. We have come a long way. *Am J Pathol*. 2012; 181: 1484–92.
- 20) Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW *et al*. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002401.
- 21) Langhorne J, Buffet P, Galinski M, Good M, Harty J, Leroy D, *et al*. The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. *Malar J*. 2011; 10: 23.

- 22)Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 810-20.
- 23)Hempel C, Hyttel P, Staals T, Nyengaard JR, Kurtzhals JAL. Erythropoietin treatment alleviates ultrastructural myelin changes induced by murine cerebral malaria. Malar J. 2012; 11: 216.
- 24)McQuillan JA, Mitchell AJ, Ho YF, Combes V, Ball HJ, Golenser J, *et al.* Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. Int J Parasitol. 2011; 41:155-63.
- 25)Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BPT, Andrade BG, Souza TM, *et al.* Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. Malar J. 2010; 9: 85.
- 26)Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, *et al.* Genetic differences among C57BL/6 substrains. Exp Anim. 2009; 58: 141-49.
- 27)National-Academies.org [Internet]. Washington: Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) International Laboratory Code Registry. [actualizado 2014; consultado 6 de noviembre de 2014]. Disponible en: <http://www.dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>
- 28)Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Frevort U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002982.
- 29)Rojas L. *Plasmodium*. Libro de Microbiología y Parasitología Médicas. v. III. Ciudad de La Habana: Editorial ECIMED; 2001.
- 30)William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, *et al.* Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 1248-55.
- 31)Grüning C, Moon RW, Lim C, Holder AA, Blackman MJ, Duraisingh MT. Human red blood cell-adapted *Plasmodium knowlesi* parasites: a new model system for malaria research. Cell Microbiol. 2014; 16: 612-20.
- 32)Ramiro RS, Reece SE, Obbard DJ. Molecular evolution and phylogenetics of rodent malaria parasites. BMC Evol Biol. 2012; 12: 219.

- 33) Despommier H, Gwads J, Hotez P, Knirsch K. Parasitic Diseases. Fifth Edition.9. The Malaras. New York: Apple Trees Productions; 2005.
- 34) White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. Malar J 2011; 10: 297.
- 35) Guttery DS, Holder AA, Tewari R. Sexual Development in *Plasmodium*: Lessons from functional analyses. PLoS Pathog 2012; 8: e1002404.
- 36) Pongponratn E, Turner GD, Day NP, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 2003; 69: 345-59.
- 37) Doumbo OK, Thera MA, Koné AK, Raza A, Tempest LJ, Lyke KE, et al. High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. Am J Trop Med Hyg 2009; 81: 987-93.
- 38) White NJ, Pukrittayakamee S, Tinh Hien T, Abul Faiz M, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet 2014; 383: 723-35.
- 39) Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humane insights from splenic physiology. Blood 2011; 117: 381-92.
- 40) Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. Clin Exp Immunol. 2011; 166: 218-26.
- 41) Ghosh S, Sengupta A, Sharma S, Sonawat HM. Metabolic perturbations of kidney and spleen in murine cerebral malaria: 1H NMR-based metabolomic study. PLoS ONE 2013; 8: e73113.
- 42) Planche T, Krishna S. The relevance of malaria pathophysiology to strategies of clinical management. Curr Opin Infect Dis 2005; 18:369–375.
- 43) Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. Am J Pathol. 2011; 178: 2146-58.

- 44) Mohanty S, Taylor TE, Kampondeni S, Potchen MJ, Panda P, Majhi M, *et al.* Magnetic resonance imaging during life: the key to unlock cerebral malaria pathogenesis. *Malar J.* 2014; 13: 276.
- 45) Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 555-68.
- 46) Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol.* 2007; 2: 217-49.
- 47) Milner DA, Whitten RO, Kamiza S, Carr R, Liomba G, Dзамалала C, *et al.* The systemic pathology of cerebral malaria in African children. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 104.
- 48) Rénia L, Gruner AC, Snounou G. Cerebral malaria: in praise of epistemes. *Trends Parasitol.* 2010; 26: 275-7.
- 49) White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis.* 2013; 208: 192-8.
- 50) Hanson J, Lam SW, Mahanta KC, Pattnaik R, Alam S, Mohanty S, *et al.* Relative contributions of macrovascular and microvascular dysfunction to disease severity in falciparum malaria. *J Infect Dis.* 2012; 206: 571-79.
- 51) Anstey NM, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, *et al.* Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis.* 2007; 195: 589-96.
- 52) Van den Steen PE, Deroost K, Deckers J, Van Herck E, Struyf S, Opdenakker G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends Parasitol* 2013; 29: 346-58.
- 53) Nguansangiam S, Day NP, Hien TT, Mai NT, Chaisri U, Riganti M, *et al.* A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 2007; 12: 1037–50.
- 54) Martins YC, Daniel-Ribeiro CT. A new hypothesis on the manifestation of cerebral malaria: The secret is in the liver. *Med Hypotheses* 2013; 81: 777–83.

- 55)McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, *et al.* Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis* 2012; 12:388–96.
- 56)Rojas L. Manual de procedimientos técnicos para el diagnostico de la malaria. La Habana: MINSAP; 2009.
- 57)Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scherf A. *Methods in Malaria Research*. Third ed. Virginia: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; 2000.
- 58)Fuehrer HP, Noedl H. Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 387- 91.
- 59)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: 177-88.
- 60)Lackner P, Beer R, Helbok R, Broessner G, Engelhardt K, Brenneis C, *et al.* Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malar J* 2006; 5: 116.
- 61)Combes V, Guillemin GJ, Chan-Ling T, Hunt NH, Grau GER. The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes *Trends Parasitol*; 2012, 28: 311-19.
- 62)Desruisseaux MS, Machado FS, Weiss LM, Tanowitz HB, Golightly LM. Cerebral malaria. A vasculopathy. *Am J Pathol*. 2010; 176: 1075-78.
- 63)Hempel C,Combes V,Hunt NH, Kurtzhals JAL, GrauGER. CNS Hypoxia is more pronounced in murine cerebral than noncerebral malaria and is reversed by erythropoietin. *Am J Pathol*. 2011; 179: 1939–50.
- 64)Waknine-Grinberg J, Hunt N, Bentura-Marciano A, McQuillan J, Chan H, Chan W, *et al.* Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J*. 2010; 9: 227.
- 65)Jennings VM, Lal AA, Hunter RL. Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. *Infect Immun*. 1998; 66: 5972-79.

- 66)Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, De Souza JB. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun.* 2000; 68: 5364-76.
- 67)Carvalho LJ. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 2010; 26: 271-2.
- 68)Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001032.
- 69)Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Guidelines for the treatment of malaria. Ginebra: OMS; 2010.
- 70)Riley EM, Couper KN, Helmby H, Hafalla JCR, Brian de Souza J, Langhorne J, *et al.* Neuropathogenesis of human and murine malaria. *Trends Parasitol.* 2010; 26: 277-8.
- 71)Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, *et al.* Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microb Infection.* 2010; 12: 1198-1207.
- 72)Clemmer L, Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJM. Artemether and artesunate show the highest efficacy to rescue mice with late-cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1383-90.
- 73)Rogers DC, Fisher EMC, Brown SDM, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Gen.* 1997; 8: 711-13.
- 74)Gumede B, Folb P, Ryffel B. Oral artesunate prevents *Plasmodium berghei* Anka infection in mice. *Parasitol Int.* 2003; 52: 53-59.
- 75)Golenser J, McQuillan J, Hee L, Mitchell AJ, Hunt NH. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006; 36: 583-93.
- 76)Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, *et al.* Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000963.

- 77) Dai M, Freeman B, Shikani HJ, Bruno FP, Collado JE, Macias R, *et al.* Altered regulation of Akt signaling with murine cerebral malaria, effects on long-term neuro-cognitive function, restoration with lithium treatment. PLoS One. 2012; 7: e44117.
- 78) Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Cap 11. Principios éticos de la experimentación animal. Madrid: Mc Graw-Hill; 2001.
- 79) Centro estatal para el control de los medicamentos, equipos y diagnosticadores (CECMED). Regulación 64-2012: "Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los Comités Institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL). Resolución 11-2013.
- 80) Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen & Co; 1959.
- 81) Hawkins P. Reducing suffering through refinement of procedures: report of the 2003 RSPCA/UFAW rodent welfare group meeting. Anim Technol Welfare 2004; 3: 79-85.
- 82) Vanda-Cantón B. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. Lab Acta 2003; 15: 69-73.
- 83) Whiting E. The 3 Rs, a breeder's perspective. Anim Technol Welfare 2006; 5: 37-40.
- 84) Morton DB. Punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. Lab Animal 2005; 8: 5-12.
- 85) Van den Heuvel MJ, Clark DG, Fielder RJ. The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Food Chem Toxicol 1990; 28: 469-82.
- 86) Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health evaluation of experimental laboratory mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2012; 2: 145-65.
- 87) Lopes de Souza N, Bernardino Merusse JL. Capítulo 9. Identificacao e registros. En: Comissao de Ensino COBEA, editor. Manual para técnicos em bioterismo. 2da Edición. Sao Paulo: Winner Graph; 1996.

- 88)Asociación Holandesa para la Ciencia de Animales de Laboratorio (NVP). Humane endpoints in Laboratory Animal Experimentation [CD-ROM]. Netherlands; 2006.
- 89)Paxinos G, Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd edition, San Diego: Academic Press; 2003.
- 90)Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M *et al.* Pathological tole of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immun* 2006; 19: 67-79.
- 91)Unión Europea. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union L 276.
- 92)Gruda MC,Pinto A, Craelius A, Davidowitz H, Kopacka WM, Li J,*et al.* A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49: 826–831.
- 93)Epiphanio S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataíde R, *et al.* VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000916.
- 94)Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ, *et al.* Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 2007; 110: 18-28.
- 95)Neres R, Marinho CR, Goncalves LA, Catarino MB, Penha-Goncalves C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* Anka infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PLoS One* 2008; 3: e1608.
- 96)Solomon W, Wilson NO, Anderson L, Pitts S, Patrickson J, Liu M, *et al.* Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria. *J Neuroinflammation* 2014, 11: 9-22.
- 97)Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ.Cerebral Malaria; mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome.*Pediatr Res.* 2010; 68: 267–74.
- 98)Mishra SK, Wiese L. Advances in the management of cerebral malaria in adults. *Curr Opin Neurol* 2009; 22: 302-7.

- 99) Kihara M, Carter JA, Holding P, Vargha-Khadem F, Scott RC, Idro R, *et al.* Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. *Malar J.* 2009; 8: 273.
- 100) Idro R, Carter JA, Fegan G, Neville BG, Newton CR. Risk factors for persisting neurological and cognitive impairments following cerebral malaria. *Arch Dis Child.* 2006; 91:142–48.
- 101) John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, *et al.* Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics.* 2008; 122: e92–e99.
- 102) Buckingham SC, Ramos TN, Barnum SR. Complement C5-deficient mice are protected from seizures in experimental cerebral malaria. *Epilepsia.* 2014; 55: e139-42.
- 103) Milner Jr. D, Factor R, Whitten R, Carr RA, Kamiza S, Pinkus G, *etal.* Pulmonary pathology in pediatric cerebral malaria. *Hum Pathol* 2013; 44: 2719-26.
- 104) Maguire GP, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, *et al.* Lung Injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis.* 2005; 192: 1966–1974.
- 105) Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos E *Ret al.* Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain Anka)-infected mice. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 271-8.
- 106) Bucher K, Dietz K, Lackner P, Pasche B, Fendel R, Mordmüller B *et al.* *Schistosoma* co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2010; 41: 21-31.
- 107) Hunter J E, Butterworth J, Perkins N D, Bateson M, Richardson C A. Using body temperature, food and water consumption as biomarkers of disease progression in mice with E1-myc lymphoma. *Brit J Cancer* 2014; 110: 928–

- 108) Ray MA, Johnston NA, Verhulst S, Trammell RA, Toth LA. Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49: 282–88.
- 109) Fan LW, Kaizaki A, Tien LT, Pang Y, Tanaka S, Numazawa S, *et al.* Celecoxib attenuates systemic lipopolysaccharide induced brain inflammation and white matter injury in the neonatal rats. *Neuroscience.* 2013; 240: 27–38.
- 110) Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-Y, Kidambi T, Gomez ND, Taylor T, *et al.* A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE* 2010; 5: e13124.
- 111) Crawley JN Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 2008; 57: 809–18.
- 112) Wurbel H. Behavioral phenotyping enhanced–beyond (environmental) standardization. *Genes Brain Behav* 2002; 1: 3–8.
- 113) Brown SD, Hancock JM, Gates H. Understanding mammalian genetic systems: the challenge of phenotyping in the mouse. *PLoS Genet* 2006; 2: e118.
- 114) Mandillo S, Tucci V, Hölter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, *et al.* Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics.* 2008; 34: 243–255.
- 115) Miranda A.S, Vieira L.B., Lacerda-Queiroz N., Souza A.H., Rodrigues D.H., Vilela M.C, *et 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: 1173-77.
- 116) Sousa LF, Coelho FM, Rodrigues DH, Campos AC, Barcelos LS, Teixeira MM, *et al.* Blockade of CXCR1/2 chemokine receptors protects against brain damage in ischemic stroke in mice. *Clinics.* 2013; 68: 391-94.
- 117) Carvalho L J M, Lenzi H L, Pelajo-Machado M, Oliveira D N, Daniel-Ribeiro C T, Ferreira-da-Cruz M F. *Plasmodium berghei*: cerebral malaria in CBA mice is not clearly related to plasma TNF levels or intensity of histopathological changes. *Exp Parasitol* 2000; 95: 1–7.

- 118) Togbe D, Schofield L, Grau GE, Schnyder B, Boissay V, Charron S *et al.* Murine cerebral malaria development is independent of Toll-like receptor signaling. *Am J Pathol* 2007; 170: 1640-48.
- 119) Ampawong S, Chaisri U, Viriyavejakul P, Nontprasert A, Grau GE, Pongponratn E. Electron microscopic features of brain edema in rodent cerebral malaria in relation to glial fibrillary acidic protein expression. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 2056-67.
- 120) Hunt NH, Ball HJ, Hansen AM, Khaw LT, Guo J, Bakmiwewa S, *et al.* Cerebral malaria: gamma-interferon redux. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 113-125.
- 121) Rénia L, Howland SW. Targeting the olfactory bulb during experimental cerebral malaria. *Trends Parasitology* 2014; 30: 375-376.
- 122) Treuting PM, Dintzis SM, Frevert CW, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: A mouse and human atlas.* San Diego: Academic Press; 2012.
- 123) Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria. The role of the endothelial barrier. *Virulence* 2013; 4: 543-555.
- 124) Rénia L, Howland SW, Claser C, Gruner AC, Suwanarusk R, Teo T, *et al.* Cerebral malaria. Mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence* 2012; 3:193–201.
- 125) Howland SW, Poh CM, Gun SY, Claser C, Malleret B, Shastri N, *et al.* Brain microvessel cross-presentation is a hallmark of experimental cerebral malaria. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 916–931.
- 126) Suidan GL, Mcdole JR, Chen Y, Pirko I, Johnson AJ. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e3037.
- 127) Pai S, Qin J, Cavanagh L, Mitchell A, El-Assaad F, Jain R, *et al.* Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004236.

- 128) Johnson HL, Willenbring RC, Jin F, Manhart WA, LaFrance SJ, Pirko I, *et al.* Perforin competent CD8 T cells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. PLoS ONE 2014; 9: e111401.
- 129) Polimeni M, Prato M. Host matrix metalloproteinases in cerebral malaria: new kids on the block against blood–brain barrier integrity? Fluids Barriers CNS 2014; 11:1-25.
- 130) Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, González-Neira A, López-Jiménez A, *et al.* Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. Transgenic Res. 2011; 20: 481-9.
- 131) Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, *et al.* Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. J Neurogenet. 2008; 22: 315–31.
- 132) Geurts N, Martens E, Verhenne S, Lays N, Thijs G, Magez S, *et al.* Insufficiently defined genetic background confounds phenotypes in transgenic studies as exemplified by malaria infection in TLR9 knockout mice. PLoS ONE 2011; 6: e27131.
- 133) Campino S, Bagot S, Bergman M-L, Almeida P, Sepúlveda N, Pied S, *et al.* Genetic control of parasite clearance leads to resistance to *Plasmodium berghei* Anka infection and confers immunity. Genes Immun 2005; 6: 416–21.
- 134) Van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, Geurts N, Martens E, Struyf S, *et al.* CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma induced chemokines. Eur J Immunol 2008; 38: 1082–95.
- 135) Deroost K, Lays N, Pham T-T, Baci D, Van den Eynde K, Komuta M *et al.* Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the *Plasmodium* strain. PLoS ONE 2014; 9: e113519.

