

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

SANDRA GABRIELA KLEIN

Utilização de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-Glicosilfosfatidilinositol  
(GPI) como potencial tratamento para malária cerebral em modelo murino

Uberlândia

2021

SANDRA GABRIELA KLEIN

Utilização de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-Glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium falciparum* como potencial tratamento para malária cerebral em modelo murino

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Médico(a) Veterinário(a).

Orientador: Prof. Dr. Tiago W. P. Mineo

Coorientador: Dr. Murilo Vieira da Silva

Uberlândia

2021

SANDRA GABRIELA KLEIN

Utilização de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-Glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium falciparum* como potencial tratamento para malária cerebral em modelo murino

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Médico(a) Veterinário(a).

Uberlândia, 17 de junho de 2021

Banca examinadora:

---

Matias Juan Pablo Szabó – Doutor UFU

---

Mylla Spirandelli da Costa – Doutora UFU

---

Tiago Wilson Patriarca Mineo – Doutor UFU

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Darci e Clair e irmão Eduardo por todo o apoio e incentivo, por me ajudarem sempre da melhor forma que puderam e por me proporcionarem a base de caráter e princípios que com certeza fizeram toda a diferença na minha caminhada.

Ao meu namorado Igor por tornar tudo mais leve e simples. Obrigada por todo o incentivo, atenção e companheirismo, por me fazer tão bem e ser sempre presente!

À Yasmim, a Daniella, o Chewie, a Agnes e a Lara, minha família de Uberlândia, que me ajudam, me animam, me acordam e me incentivam a continuar.

Ao meu orientador de estágio, de IC, coorientador de TCC e principalmente amigo Murilo por todos os ensinamentos, oportunidades, desafios e confiança. O seu método de ensino de abrir as portas e dizer “vai lá e faz” sempre me fez aprender muito!

À equipe do corpo técnico da REBIR, que também são meus amigos: Fabiano, Loyane, Rafael, Taísa, Simone... Muito obrigada por todos os ensinamentos, cafés, trocas de ideias, parcerias e por sempre me ouvirem e auxiliarem em tudo que precisei no biotério. Obrigada também pelo trabalho que fazem, sempre em prol da qualidade e bem estar dos nossos animais!

Agradeço à Mylla, que muito contribuiu na realização deste trabalho, que me ajudou, ensinou e viveu comigo as emoções dos experimentos com malária.

À Bruna, minha “estagiária pós-doc” que me auxiliou nos experimentos, me ensinou sobre citometria, técnicas de laboratório e me contou muitas histórias no tempo em que estive conosco no biotério.

À professora Wânia, por tudo que me ensinou sobre malária em camundongos, por toda a paciência, dedicação e auxílio prestados.

À todos os componentes do grupo de pesquisa GEMA (grupo de estudos em modelos animais) que contribuíram com ideias, críticas e sugestões durante os Lab Meetings.

Ao professor Tiago pela disposição em me orientar e por todos os conhecimentos passados!

Ao professor Luiz Ricardo pela parceria com o Laboratório de Nanobiotecnologia e por me proporcionar bolsa neste projeto.

Aos órgãos de fomento UFU, Ministério Público, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelos recursos financeiros necessários para a realização dos experimentos.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível, meus sinceros agradecimentos!

**não basta  
cair**

**é preciso  
pular de**

**cabeça**

*Manoel de Areia*

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e responsável pela morte de centenas de milhares de pessoas todos os anos. Sua complicação para o quadro cerebral atinge principalmente crianças e é a razão da maioria dos óbitos e sequelas da enfermidade. Atualmente, alguns protocolos de tratamento estão disponíveis e atuam principalmente na replicação do parasito, no entanto, para os quadros neurológicos ainda não existem tratamentos eficazes, sendo necessário estudos de novas drogas. Com base nisso, este trabalho teve como objetivo determinar o potencial efeito terapêutico de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-Glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium* em ensaio pré-clínico. Para isto, camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com *Plasmodium berghei*-ANKA (*P. berghei* - ANKA) e tratados com scFv anti-GPI nos dias 0, 3 e 6 pós infecção, os controles infectados foram tratados com solução salina (PBS) e os controles não infectados tratados com scFv ou PBS. Os animais foram avaliados quanto ao escore de morbidade e mortalidade, peso corporal, parasitemia e hemograma. Nossos resultados demonstram que o tratamento com scFv anti-GPI em animais infectados com *P. berghei* - ANKA resgatou 70% dos animais desafiado, promoveu a recuperação da perda de peso inicial provocada pela infecção, eliminou completamente os sinais neurológicos da malária cerebral (MC), bem com os sinais sistêmicos da doença, reduziu a parasitemia e melhorou parâmetros sanguíneos desses animais, mostrando importante efeito terapêutico na patologia da malária cerebral experimental (MCE).

**Palavras-chave:** *Plasmodium berghei*. Nanobiotecnologia. Anticorpo. Resposta imune

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by a protozoa of the *Plasmodium* genus, responsible for the deaths of hundreds of thousands of people every year. Cerebral malaria mainly affects children and is the reason for most deaths and sequelae of the disease. Currently, some treatment protocols are available which act mostly on parasite replication, however, for neurological cases, there is still a need for treatments with higher efficiency, requiring studies of new drugs. Based on that, our goal was to determine the potential therapeutic effect of a single-chain variable (scFv) anti-Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in *Plasmodium berghei* infection in a preclinical trial. For this, C57BL/6 mice were infected with *Plasmodium berghei*-ANKA (*P. berghei* - ANKA) and treated with scFv anti-GPI on days 0, 3 and 6 post infection, the infected controls were treated with saline solution (PBS ) and uninfected controls treated with scFv or PBS. The animals were evaluated for morbidity and mortality scores, body weight, parasitemia and blood count. Our results demonstrate that treatment with anti-GPI scFv in animals infected with *P. berghei* - ANKA rescued 70% of the challenged mice, promoted recovery from initial weight loss caused by the infection, completely eliminated neurological signs of cerebral malaria (CM), as well as the systemic signs of the disease, reduced parasitemia and improved blood parameters in these animals, showing an important therapeutic effect in the pathology of experimental cerebral malaria (ECM).

**Keywords:** *Plasmodium berghei*. Nanobiotechnology. Antibody. Immune response

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp. ....</b>	<b>8</b>
<b>2.2</b>	<b>Patogênese e síndromes associadas à malária .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>Tratamento da malária .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Single-chain variable fragment</i> (scFv) como proposta terapêutica.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<b>5.1</b>	<b>Declaração de Ética .....</b>	<b>13</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressão e purificação do scFv.....</b>	<b>13</b>
<b>5.3</b>	<b>Animais .....</b>	<b>13</b>
<b>5.4</b>	<b>Manutenção do parasito e infecção experimental.....</b>	<b>14</b>
<b>5.5</b>	<b>Delineamento experimental <i>in vivo</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Mortalidade.....</b>	<b>15</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Peso corporal .....</b>	<b>16</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Morbidade.....</b>	<b>16</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Parasitemia.....</b>	<b>17</b>
<b>5.5.5</b>	<b>Hematologia.....</b>	<b>17</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária potencialmente fatal e de distribuição global. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 houveram 229 milhões de casos e 409 mil mortes decorrentes de malária, sendo a região Africana da OMS a mais afetada com 93% dos casos e 94% das mortes, seguido da região do Sudeste Asiático e da região do Mediterrâneo Oriental com 3,4% e 2,1% dos casos respectivamente. Na América Latina, no mesmo ano, foram registrados 929 mil casos, onde os principais países afetados foram Venezuela (51%), Brasil (23%), Colômbia (10%) e Peru (6%), todos pertencentes à região amazônica onde as condições ambientais são favoráveis a proliferação do vetor da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A transmissão da malária ocorre por meio da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* spp. infectada com protozoários do gênero *Plasmodium* (OPAS, 2019). Dentro deste gênero existem cinco espécies que podem causar a doença em humanos, entretanto *P. falciparum* e *P. vivax* são as duas responsáveis pelo maior número de casos e mortes, com predomínio de *P. falciparum* na África e Ásia e de *P. vivax* nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Quando infectado, o hospedeiro humano pode se apresentar sintomático ou assintomático e os quadros de doença, quando presentes, variam de leves a letais. Assim, a malária é comumente diferenciada em não complicada onde o paciente apresenta sintomas como dores de cabeça, febre, dores musculares e letargia, e malária complicada com evolução para quadros como anemia grave, acidose metabólica e malária cerebral (CM) (MILNER, 2018).

Atualmente existem diversos protocolos estabelecidos para o tratamento da malária não complicada, no entanto para a malária grave especificamente para a CM, responsável pela maioria das mortes ainda não há nenhum fármaco ou protocolo de fato eficiente. Somado a isto, a patofisiologia da doença ainda não está totalmente esclarecida, o que dificulta intervenções e tratamentos sintomáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Com isso, tem-se optado pelo uso de modelos animais na busca de novos tratamentos, vacinas e conhecimento dos mecanismos da doença. Um modelo bem estabelecido para o estudo da malária cerebral é a infecção por *P. berghei* - ANKA em camundongos da linhagem C57BL/6. Esses animais compartilham muitas características com a CM humana, dentre elas paralisia, convulsões, tremores, coma e óbito em fase aguda (GHAZANFARI; MUELLER; HEATH, 2018; TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018).

Com o estabelecimento do modelo animal de estudo novas drogas e alvos terapêuticos tem sido explorados e dentre eles está o glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma molécula reconhecida como padrão molecular associado à patógenos (PAMP) indutora de citocinas pró-inflamatórias importantes na patogênese da CM. Embora todas as células eucarióticas apresentem GPI em sua superfície, o GPI de *P. falciparum* e o GPI humano são estruturalmente diferentes, o que permite que o GPI do parasito seja um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (DE SOUZA et al., 2002; GOWDA, 2007; MBENGUE et al., 2016; NAIK et al., 2006). Diante disso, levantou-se a hipótese de que um anticorpo, ou parte dele, com ação anti-GPI de *Plasmodium* poderia ter efeito positivo contra o agravamento dos quadros de malária.



## 2.2 Patogênese e síndromes associadas à malária

Na malária não complicada os sintomas geralmente aparecem após a primeira ruptura dos hepatócitos pelos esquizontes e consequente liberação dos merozoítos para a circulação periférica, induzindo a ativação de resposta imune, principalmente, através dos mediadores: Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina 10 (IL-10), as quais implicarão em febre, dor de cabeça, dor muscular, vômitos e letargia. Os sintomas duram de 6 a 12 horas e se repetem em ciclos de aproximadamente 48 horas, período necessário para a liberação de novos merozoítos, e que pode variar de acordo com a espécie de *Plasmodium* que está causando a infecção (GUN et al., 2014; OAKLEY et al., 2011; SCHOFIELD; GRAU, 2005). A malária grave (ou complicada), por sua vez, é caracterizada por três síndromes sobrepostas: CM, anemia grave e acidose metabólica, síndromes estas resultantes, dentre outros fatores, do sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura, ativação endotelial, respostas inflamatórias sistêmicas e funcionamento prejudicado de órgãos como pulmões, rins, fígado, placenta e cérebro (MACKINTOSH; BEESON; MARSH, 2004; TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018; WHITE et al., 2014).

## 2.3 Tratamento da malária

O tratamento da malária visa atingir o parasito em pontos chave de seu ciclo biológico: (1) Interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestação clínica da doença; (2) Destruição do parasito pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas do parasito das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias; (3) Interrupção da transmissão do parasito pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas do mesmo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Nos diferentes países da América Latina diferenças em relação às drogas, doses e associações utilizadas, são observadas. Contudo, a premissa geral baseia-se nos seguintes protocolos. A cloroquina (CQ), droga largamente utilizada para o tratamento de estágios assexuais do parasito (esquizontes sanguíneos), sendo utilizada uma dose de 10 mg/kg no primeiro dia, seguido de 7,5 mg/kg nos dias dois e três de tratamento, totalizando uma dose de 25 mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A Primaquina (PQ), na dosagem de 3,5 mg/kg durante 7 a 14 dias, também tem sido utilizada em protocolos associativos com cloroquina para um tratamento de casos mais radicais da malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Além disso, outras associações

envolvendo, por exemplo, Artemisenima, Mefloquina, também tem sido utilizadas (RECHT et al., 2017). Importante ressaltar que diversos fatores como: idade do paciente, peso, estado nutricional, carga e espécie do parasito e gravidez devem ser considerados pelo médico no momento de montar um protocolo terapêutico.

#### **2.4 *Single-chain variable fragment* (scFv) como proposta terapêutica**

A construção de moléculas recombinantes de anticorpos artificiais, geralmente na forma de fragmentos polipeptídicos, que se comportam igualmente aos anticorpos originais, tem sido uma alternativa terapêutica no combate de diversas doenças como câncer, doenças virais e parasitárias (ZHOU et al., 2017). Dentre estas moléculas está o scFv, o qual apresenta domínios variáveis de cadeias leves e pesadas unidas por um peptídeo conector (*linker*) e possui peso molecular de aproximadamente 30 kDa (AHMAD et al. 2012).

Os anticorpos separados em subunidades funcionais, com base na estrutura de domínio do anticorpo, podem ser combinados artificialmente. Isso possibilita a criação de moléculas de alta especificidade para atuação em alvos pré-determinados. Além disso, esses fragmentos de anticorpo possuem algumas vantagens em relação a utilização de moléculas de anticorpo inteiras: (1) moléculas menores chegam de forma mais rápida e uniforme aos tecidos em relação à moléculas maiores; (2) possuem baixa retenção em tecidos não alvo; (3) possuem custo comercial baixo quando em grande escala de produção; (4) podem ser acoplados a drogas e radionucleotídeos, a fim de resultar em baixa exposição do tecido saudável (AHMAD et al., 2012; WANG, et al., 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial efeito terapêutico de scFv anti-GPI de *Plasmodium* na malária cerebral em modelo murino.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito protetor de scFv através de análise de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* - ANKA.
- Avaliar a evolução clínica dos animais tratados ou não com scFV, através de escore de morbidade, peso corporal e sinais clínicos relacionados à malária cerebral;
- Traçar o perfil hematológico de camundongos desafiados com *P. berghei* - ANKA tratados ou não tratados com scFv anti-GPI;
- Avaliar a replicação parasitária na presença ou não de tratamento com scFv por meio da parasitemia em camundongos infectados com *P. berghei* - ANKA.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços na diminuição da morbidade e mortalidade por malária nos últimos anos, ainda mais de mil pessoas morrem por dia por complicações da doença, sendo a maioria destas crianças e gestantes do continente africano. Os casos letais de malária são decorrentes em quase sua totalidade por malária grave não tratada, esta caracterizada por três principais síndromes: malária cerebral, acidose metabólica e anemia severa. A taxa de mortalidade nos casos de malária cerebral é de quase 100% sem tratamento e com tratamento antimalárico imediato juntamente com tratamento de suporte é de 10 a 20%, o que ainda representa muitas mortes e aumenta substancialmente na presença de complicações múltiplas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a situação só se agrava, uma vez que a procura pelo sistema de saúde geralmente só acontece nos casos mais graves da doença, por motivos de acesso, condições financeiras e conhecimento da população. Nessas condições os tratamentos atuais possuem pouca ou nenhuma eficácia, o que resulta em prognósticos desfavoráveis além de custos maiores aos sistemas de saúde que demandam de tratamentos de suporte mais avançados. Somado a isto, quando o quadro do paciente é revertido, este frequentemente apresenta sequelas neurológicas incluindo convulsões e déficits neurocognitivos que precisam de acompanhamento médico contínuo e que comumente inabilitam atividades laborais rotineiras (SCHIESS et al., 2020).

Aditivamente, a malária é transmitida por mosquito, vetor de difícil controle e alto poder de transmissibilidade. O mosquito-palha, transmissor da malária, se alimenta de matéria orgânica como lixo doméstico, folhas e frutos apodrecidos e fezes de animais e se abriga e põe seus ovos durante o dia em locais sombreados como em residências e suas proximidades. Assim, regiões mais pobres, com saneamento básico precário e de clima tropical são as mais afetadas.

Diante do exposto buscas por novos tratamentos são necessárias, visto que a malária cerebral é uma importante questão de saúde pública que afeta milhões de pessoas todos os anos. Com isso, este trabalho tem como proposta testar em modelo murino (ensaio pré-clínico) uma potencial droga para o tratamento da malária cerebral, objetivo é utilizar a porção de um anticorpo contra uma molécula de superfície do parasito responsável por desencadear resposta imune exacerbada no hospedeiro e que está associada à CM. Outra hipótese é que ocorra a ligação deste anticorpo em vias do hospedeiro que, como já desmonstrado em outros estudos, são essenciais para o desencadeamento do quadro neurológico na presença do parasito.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Declaração de Ética**

Todos os estudos que envolveram camundongos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), sob protocolo de número 153/16 (Anexo I). Todo o manejo e cuidados com bem estar animal foram realizados em concordância com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) através de suas resoluções normativas e orientações técnicas (CONCEA, 2020). Os animais foram mantidos no Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU) que possui inscrição no CONCEA (CIAEP: 01.0105.2014) e na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (CQB: 163/02).

### **5.2 Expressão e purificação do scFv**

Anterior ao desenvolvimento desse projeto, foi realizada a seleção dos scFv ligantes de GPI, bem como analisada a especificidade dos alvos selecionados e realizado o sequenciamento dos mesmos. Com os clones já isolados, a expressão do scFv foi feita em maior escala e em seguida o sobrenadante contendo o scFv foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, em sistema HPLC (AKTATM purifier, GE Healthcare Life Sciences). Após imobilização de níquel na coluna e da adição de tampão de ligação (Imidazol 50mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4), foi adicionado o sobrenadante da cultura de bactérias, já obtido previamente. As moléculas de scFv ligadas ao níquel pela cauda de hexa-histidina (His<sub>6</sub>) foram eluídas por competição com tampão de eluição (Imidazol 500mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4). O scFv purificado foi concentrado utilizando tubo Amicon de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a concentração proteica determinada por quantificação por banda em gel por eletroforese e análise no programa ImageJ. A dose de tratamento foi determinada em 10 ug/animal.

### **5.3 Animais**

Para este estudo utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 do tipo selvagem (WT) fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, de padrão sanitário SPF - specific pathogen free (livres

de patógenos específicos). Os animais foram mantidos em micro-isoladores Alesco ventilife, com cama de maravalha de pinus autoclavada trocada semanalmente, água filtrada e autoclavada oferecida *ad libitum* e ração Nuvilab CR-1 irradiada (Quimtia) também *ad libitum*, temperatura ambiente de  $22\pm 2$  °C, umidade do ar entre 40-60% e regime de fotoperíodo claro/escuro de 12h/12h.

#### 5.4 Manutenção do parasito e infecção experimental

Para a manutenção do parasito *P. berghei* - ANKA utilizamos camundongos da linhagem BALBc, uma vez que estes animais são mais resistentes e apresentam sinais clínicos mais tardios e menos brandos do que camundongos da linhagem C57BL/6 (BOPP et al., 2010). Descongelamos alíquota de sangue parasitado e imediatamente inoculamos em um camundongo BALBc. Após 10 dias, acompanhando o quadro clínico e parasitemia do animal, coletamos uma amostra de sangue deste e inoculamos em outro animal, repetimos este processo mais uma vez, completando três passagens, para então realizar a infecção do experimento propriamente dito. Estas passagens são necessárias para estabilizar a cepa e manter as características da MCE uniformes em todos os experimentos (DE OCA et. al, 2013)

No dia da infecção experimental coletamos aproximadamente 200 ul de sangue do animal de manutenção, o qual foi previamente anestesiado com isoflurano a 3,7% e eutanasiado após a coleta. Realizamos um esfregaço sanguíneo para determinação do percentual de hemácias parasitadas, em seguida diluímos o sangue em PBS e determinamos a quantidade de hemácias por ml em Câmara de Neubauer. Assim foi possível calcular o fator de diluição necessário para termos  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas em cada 200 ul da solução (sangue + PBS), volume o qual foi inoculado em cada animal.

#### 5.5 Delineamento experimental *in vivo*

Os animais foram distribuídos em grupos experimentais da seguinte forma:

*P. berghei* - ANKA + PBS (6 animais)

*P. berghei* - ANKA + scFv (6 animais)

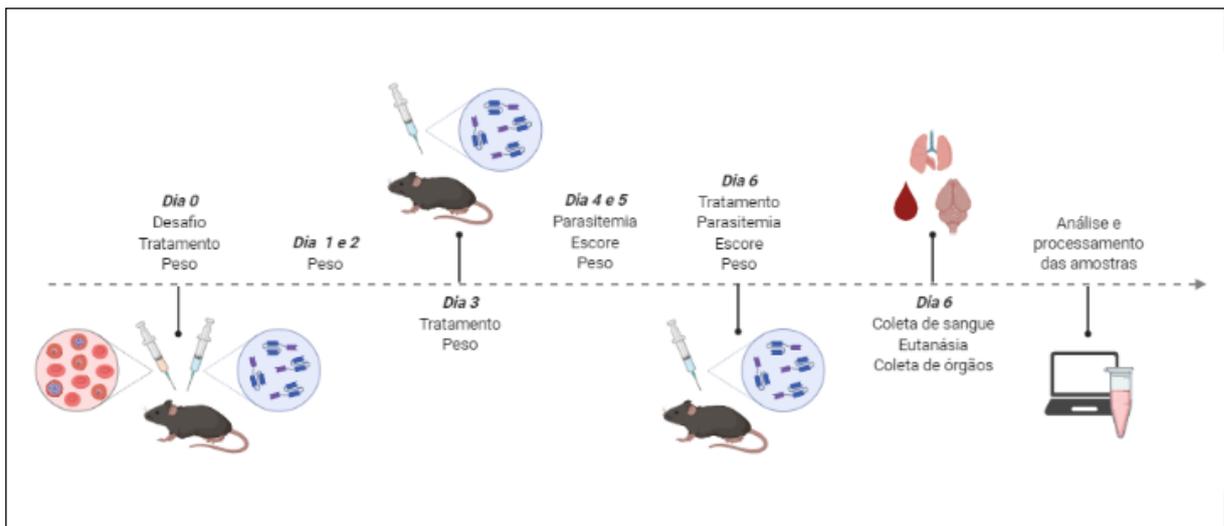
PBS (3 animais)

scFv (3 animais)

No dia 0 do experimento os animais receberam a primeira dose do tratamento por via intraperitoneal, e após 4 horas foram desafiados com *P. berghei* - ANKA pela mesma via; a

segunda e terceira dose do tratamento foram administradas nos 3° e 6° dpi, respectivamente. Os camundongos foram avaliados quanto ao peso corporal todos os dias, parasitemia (4° ao 6° dpi) e escore de morbidade (4° ao 6° dpi). Os tratamentos, pesagem, escores e parasitemia foram realizados sempre no período da manhã. No 6° dpi, no período da tarde, os animais foram anestesiados sob anestesia inalatória com isoflurano na taxa de 3,5 a 4% para coleta de sangue e posterior eutanásia e coleta de órgãos. O sangue foi destinado para análises de hemograma e bioquímicas de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e GGT (gamaglutamiltransferase). Os órgãos coletados foram cérebro, baço, rins, fígado e pulmões, dos quais estão sendo realizadas análises de citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ), parasitismo tecidual por PCR (reação em cadeia de polimerase) e histopatologia. Neste trabalho serão apresentados os resultados referentes à sobrevivência, peso corporal, morbidade, parasitemia e hemograma.

**Figura 1- Delineamento experimental in vivo**



Fonte: autoral (imagem criada com Biorender)

Legenda: No dia 0 do experimento os animais foram desafiados com *P. berghei* - ANKA e receberam a primeira dose do tratamento, a segunda e terceira dose foram administradas nos 3° e 6° dpi, respectivamente. Os camundongos foram avaliados quanto ao peso corporal todos os dias, parasitemia (4° ao 6° dpi) e escore de morbidade (4° ao 6° dpi); No 6° dpi, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e posterior eutanásia e coleta de órgãos.

### 5.5.1 Mortalidade

A curva de sobrevivência foi realizada em um experimento a parte, onde o modelo animal, processamento do scFv e parasito seguiram as mesmas condições descritas acima. Os grupos foram os seguintes: *P. berghei* - ANKA + PBS (n:6) e *P. berghei* - ANKA + scFv (n:7). Os animais foram observados diariamente durante 30 dias e os óbitos anotados e analisados utilizando o teste estatístico de Kaplan-Meier.

### 5.5.2 Peso corporal

A fim de detectar se a infecção e o tratamento poderiam interferir no peso corporal dos animais, os mesmos foram pesados do dia 0 ao dia 6 dpi, sempre no período da manhã.

### 5.5.3 Morbidade

A morbidade foi avaliada pela Escala Rápida e Quantitativa de Coma e Comportamento Murino (RMCBS) que foi adaptada de Carroll et al. 2010, o modelo da ficha de avaliação utilizada está disponível no **Anexo 2**.

Esta escala avalia o quadro clínico de malária cerebral, é composta por 10 parâmetros e foi desenvolvida para avaliar manifestações de MC em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* - ANKA. A RMCBS nos permite acompanhar a evolução da síndrome clínica, aqui validada por correlações com hemorragias e edema intracerebrais que podem provocar alterações neurológicas diferentes, dependendo da região cerebral acometida. Ela fornece uma ferramenta pela qual os animais podem ser identificados como sintomáticos ou assintomáticos, bem como avaliados quanto à evolução e/ou regressão do quadro durante o tratamento experimental.

Cada animal foi avaliado em média por 3 minutos. Esta avaliação foi feita diariamente no 4º e 5º dpi e duas vezes no 6º dpi, uma no período a manhã e outra no período da tarde. O escore total é composto por 10 parâmetros, onde cada um deles recebe uma pontuação que varia de 0 a 2, sendo 0 relacionado à baixo ou nenhum sinal de morbidade, 1 à intermediário e 2 à maiores sintomas. Assim, animais com escores maiores apresentam melhor quadro clínico.

Os 10 parâmetros avaliados são:

- Relacionados à coordenação motora: (1) Marcha e (2) Equilíbrio
- Comportamento exploratório: (3) Desempenho motor
- Força e tônus: (4) Posição corporal e (5) Força dos membros
- Reflexos e auto-preservação: (6) Escape ao toque, (7) Reflexo de pina e (8) Reflexo podal
- Comportamento relacionado à higiene: (9) Grooming/auto-limpeza e (10) Características oculares

Estes parâmetros foram compilados como um somatório de escores, bem como avaliados separadamente.

#### 5.5.4 Parasitemia

Cada camundongo teve uma gota de sangue retirada através de punção da veia lateral da cauda com agulha descartável 26G (13 x 0,45) e diluída em 200 uL de PBS, em seguida as amostras foram lidas em citometria de fluxo. O aparelho utilizado foi o BD ACCURI C6 pela excitação do laser de 488nm. Primeiramente identificamos os eritrócitos pelas suas especificidades de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e adquirimos um total de 100.000 eventos de cada amostra. Como o parasito utilizado é geneticamente modificado possuindo em sua estrutura GFP (green fluorescent protein), discriminamos os eritrócitos infectados através da porcentagem de células GFP+ dentro do *gate* de eritrócitos não infectados.

#### 5.5.5 Hematologia

O sangue para as análises hematológicas foi coletado por via retro-orbital com capilar de vidro e microtubo com capacidade para 500ul contendo anticoagulante EDTA K2 (ácido etileno-diamino-tetraacético dipotássico), o volume coletado foi de aproximadamente 100ul por animal. Os hemogramas foram realizados no equipamento Mindray BC-2800 vet, onde foram analisados os seguintes parâmetros: contagem de hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), além da análise de leucócitos totais (WBC).

Com os dados obtidos no aparelho Mindray BC-2800 vet de leucócitos totais, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos, por meio de esfregaços sanguíneos em microscopia óptica. Para a contagem dos leucócitos foram contabilizadas 100 células por lâmina. Para a obtenção dos valores finais foi utilizada a seguinte fórmula:

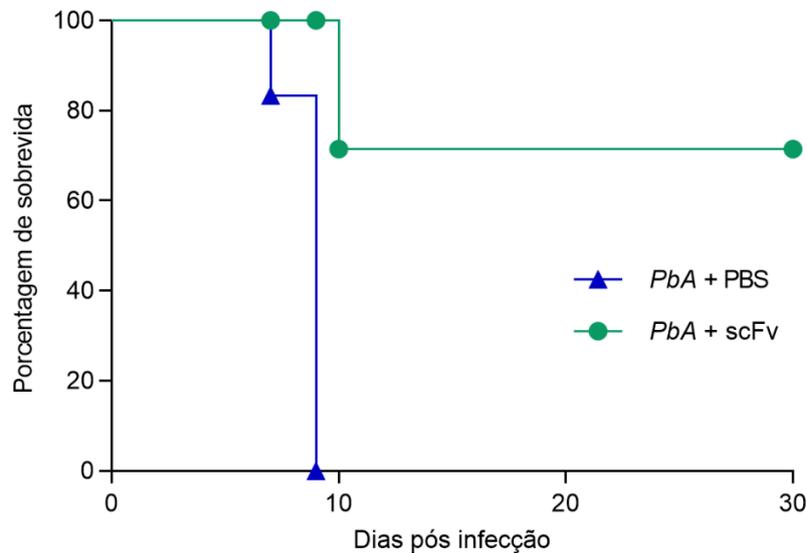
$$X \text{ (número do leucócito específico)} = \frac{\text{número de leucócitos totais} \times \text{contagem na lâmina}}{100}$$

#### 5.6 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se one-way ANOVA, two-way ANOVA ou Student's t-test, de acordo com o projeto experimental (GraphPad Prism Software, versão 9.0). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. O scFv aumenta a sobrevida de camundongos infectados com *P. berghei* - ANKA

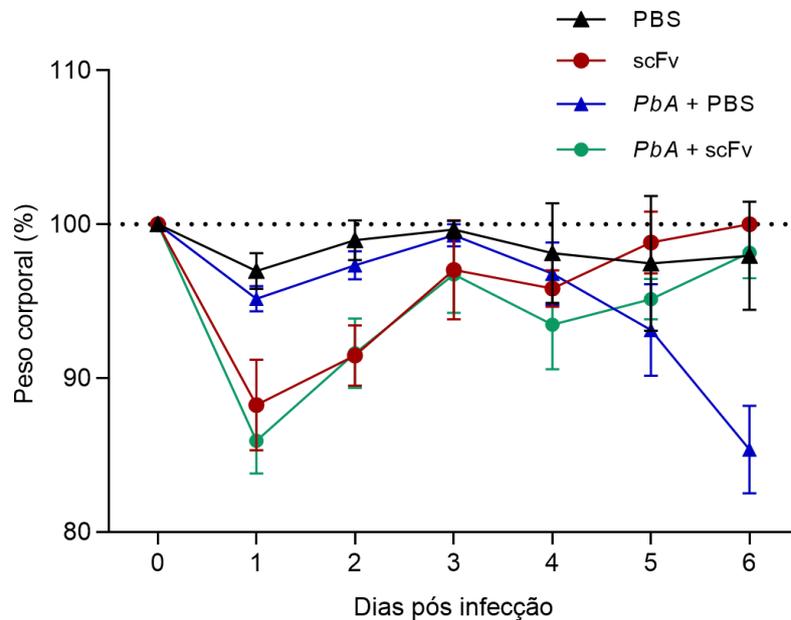


**Figura 1:** Curva de sobrevida verificou-se que o scFv aumenta a sobrevida de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* - ANKA (PbA). Grupo PbA + PBS (n: 6), grupo PbA + scFv (n:7).

Após a infecção dos animais e tratamento com PBS e scFv foi verificado que todos os animais do grupo tratado com PBS (n=6) sucumbiram entre os dias 7 e 9 pós infecção, sendo que todos desenvolveram sinais clínicos de malária cerebral. Já no grupo dos animais tratados com scFv (n=7) dois animais vieram a óbito no dia 10 pós infecção e os outros cinco animais foram acompanhados até o 30º dpi, onde ainda se encontravam vivos e sem sinais clínicos de MC (Figura 1).

Na MC, a coagulopatia intracerebral é limitante para o organismo, assim, o aumento da sobrevida nos animais tratados com scFv pode ter ocorrido pela diminuição da formação de microtrombos cerebrais, como observado por Wang et al. (2018) onde os autores viram que a inibição da glicólise utilizando 2-desoxi glicose (2DG) confere proteção contra a MC em camundongos C57BL/6. Corroborando com o nosso estudo no que diz respeito a tolerância a doença, porém discordando quanto a parasitemia que foi diminuída no tratamento com scFv, mas não no tratamento com 2DG.

## 2. Camundongos tratados com scFv, apesar de apresentarem perda de peso corporal inicial, recuperam o peso e não sucumbem à malária cerebral



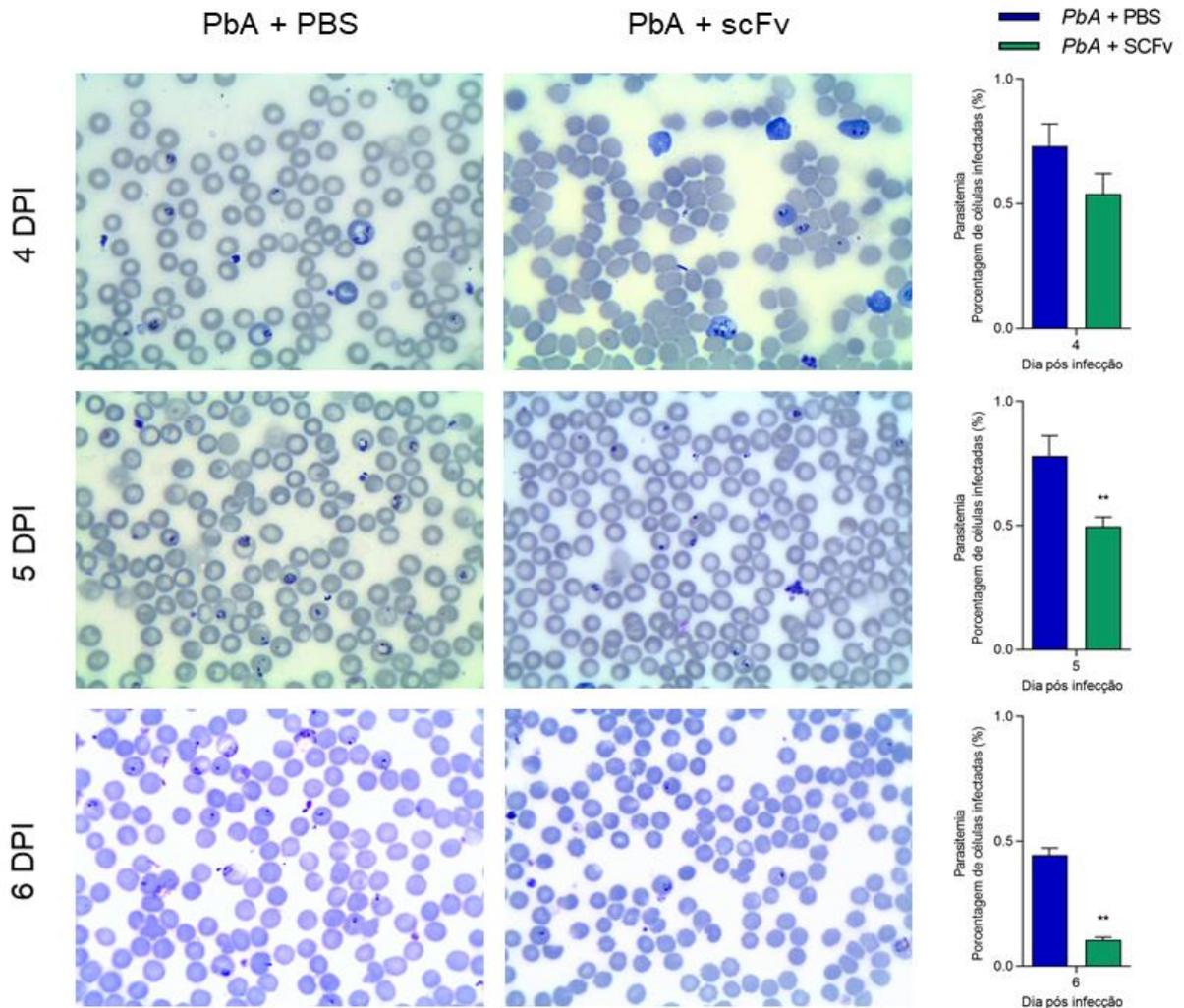
**Figura 2:** Porcentagem de ganho/perda de peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados/não infectados com *Plasmodium berghei* - ANKA (PbA), tratados/não tratados com scFv. Grupos: PBS (n=3), scFv (n=3), PbA+PBS (n=6), PbA+scFv (n=6).

Todos os grupos apresentaram perda de peso no 1º dpi, sendo a perda mais acentuada nos camundongos tratados com scFv. Nos dois dias seguintes, os animais tiveram recuperação do peso, chegando próximo ao peso inicial. Após o segundo tratamento (no 3º dpi) houve uma nova queda em todos os grupos, porém menos acentuada. O grupo infectado-não tratado teve queda progressiva de peso até o 6º dpi, enquanto os demais grupos, controles e infectado + scFv, seguiram ganhando peso. No 6º dpi foi realizada a eutanásia para posterior coleta de órgãos.

Conforme observado, infere-se que os animais tiveram perda de peso inicial devido à fatores associados ao estresse e inflamação aguda, causados pela inoculação dos veículos e principalmente dos parasitos. A perda de peso progressiva a partir do 3º dpi nos animais infectados e não tratados pode estar associada à diminuição da ingestão hídrica e alimentar (IACUC, 2018). O que está em conformidade com os sinais encontrados nos escores de morbidade que serão descritos abaixo e estão demonstrados na Figura 4. Por outro lado, os animais infectados e tratados com scFv estavam ativos e apresentaram ganho de peso corporal nos dias 2, 3, 5 e 6 pós infecção.

Como camundongos perdem peso de forma rápida na presença de doenças infecciosas esta avaliação pode ser utilizada inclusive para prever a possibilidade de morte dos animais (TRAMMELL e TOTH, 2011), o que vai de encontro com os nossos resultados de curva de sobrevivência e peso corporal. Desta forma observamos que a recuperação de peso provocada pelo tratamento com scFv nos indica melhora no quadro geral da doença e maiores chances de sobrevivência.

### 3. O scFv está relacionado com a queda progressiva da parasitemia por *P. berghei* - ANKA em camundongos

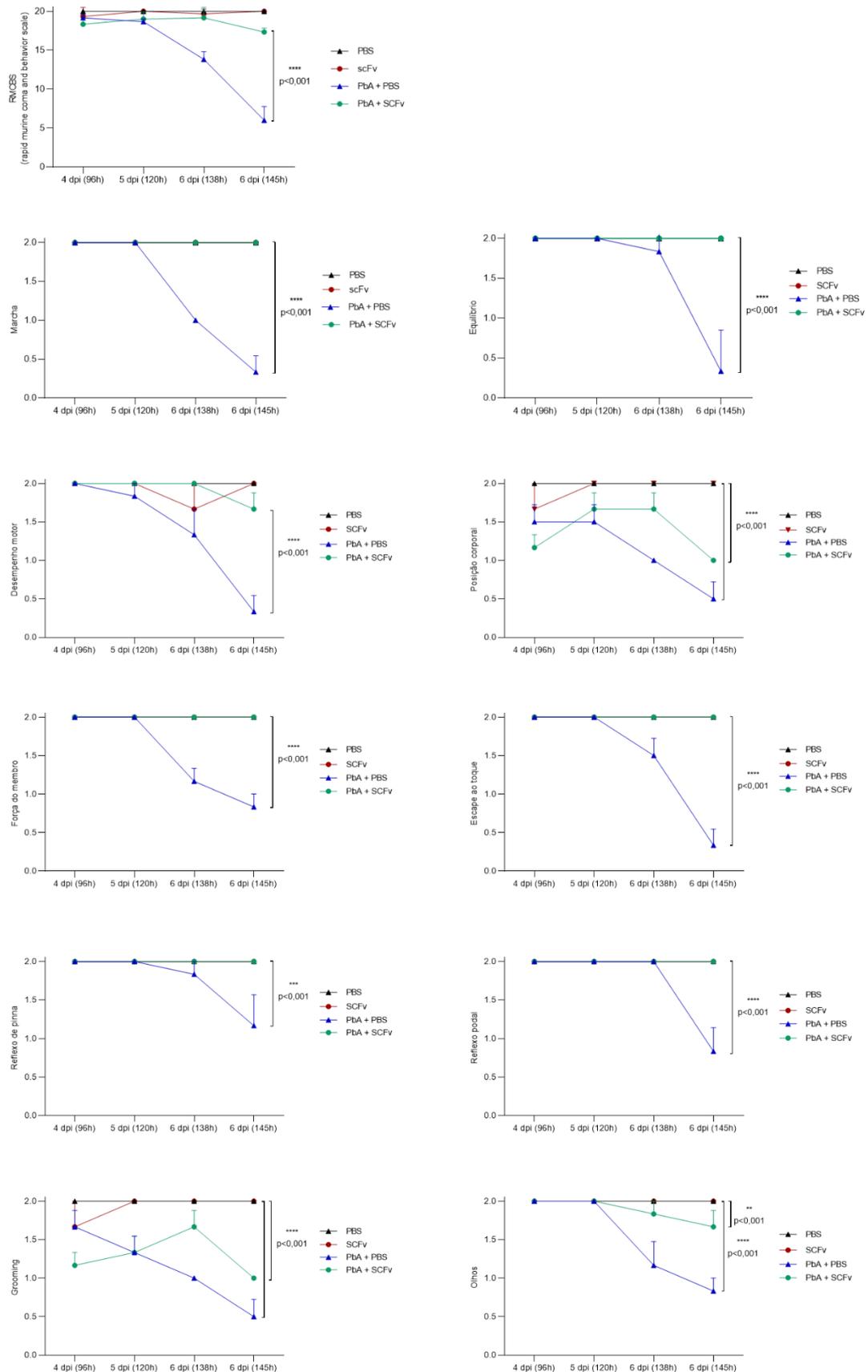


**Figura 3:** Parasitemia por citometria de fluxo; intensidade média de fluorescência nos dias 4, 5 e 6 pós infecção. Os grupos controle (não infectados) serviram para delimitar o *gate* e excluir a fluorescência emitida pelas hemácias. O parasito em questão é GFP+ e a dose infectante foi de  $10^6$  hemácias infectadas/camundongo. O gráfico apresenta média e desvio padrão. Grupos com n de 6. (\*\* p < 0,01)

A intensidade média de fluorescência foi analisada através de citometria de fluxo nos dias 4, 5 e 6 pós infecção. Os camundongos infectados com *P. berghei* - ANKA e tratados com PBS mantiveram a parasitemia do 4 dpi para o 5 dpi e apresentaram redução no 6 dpi. Os camundongos infectados com PbA e tratados com scFv apresentaram parasitemia menor em relação ao grupo controle no 5° e 6° dpi ( $p < 0,01$ ). Estes resultados nos mostram que o scFv tem ação importante na redução da parasitemia por *P. berghei* - ANKA.

A malária cerebral aguda está relacionada à aderência de hemácias infectadas na parede do endotélio vascular e, quando associada a alta parasitemia exacerba a formação de microtrombos, microhemorragias e edema em diversos órgãos, especialmente no cérebro. Assim, a carga parasitária sanguínea tem importante significado na patogenese da malária cerebral, uma vez que com o rompimento da barreira hematoencefálica ocorre a formação de edema cerebral de forma súbita provocando sinais neurológicos graves e podendo levar o indivíduo à morte (PASLOSKE e HOWARD, 1994; ADAMS et. al, 2021; POTCHEN ET AL., 2018, SEYDEL et. al, 2015).

#### **4. O tratamento com scFv elimina sinais clínicos de MCE e melhora o quadro clínico geral de camundongos infectados com *P. berghei* - ANKA**



**Figura 4:** Escores de morbidade (escala de coma e comportamento murino). O primeiro gráfico apresenta a soma

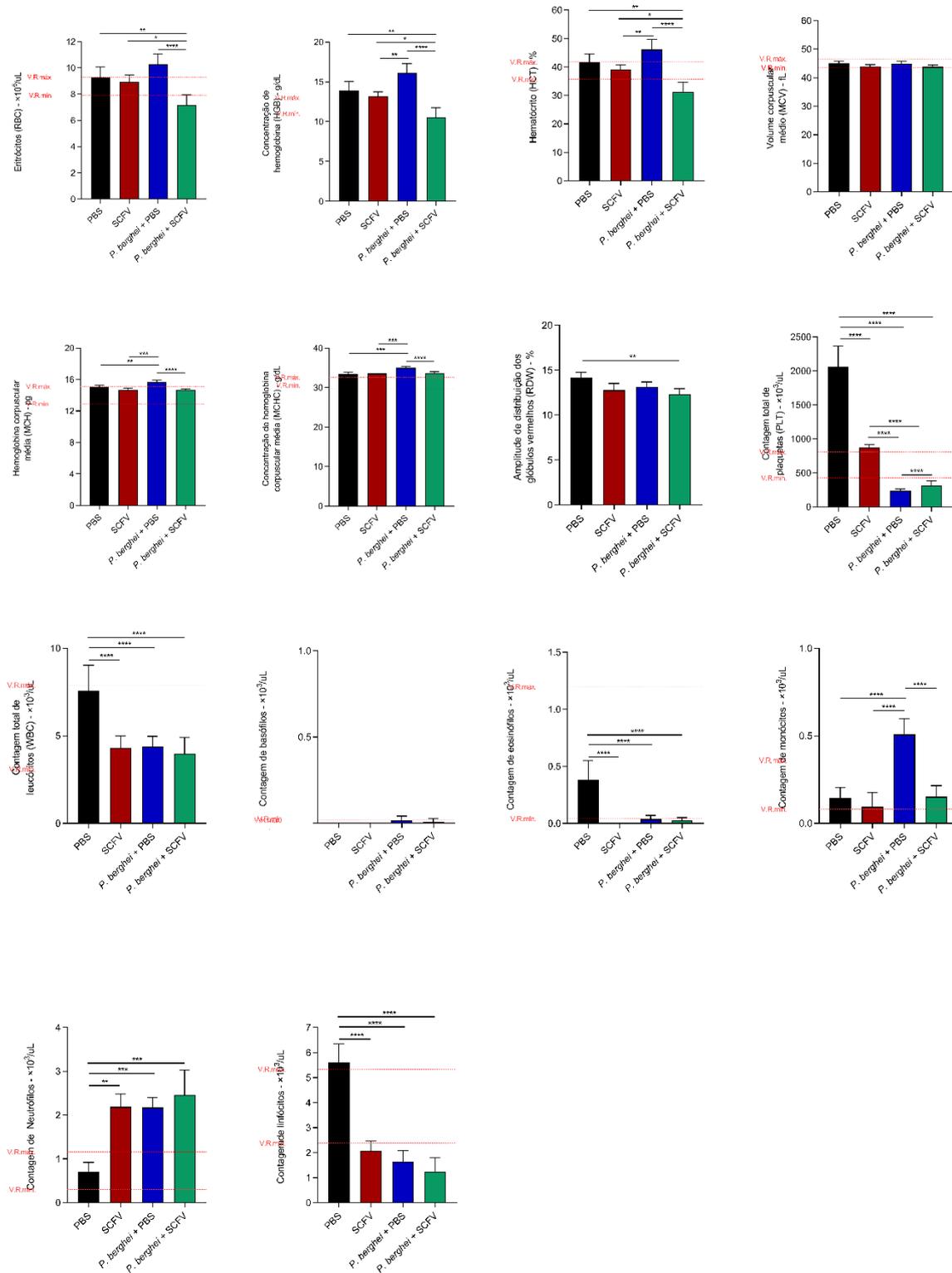
dos escores e os demais gráficos representam individualmente cada um dos parâmetros analisados. Grupos: PBS (n=3), scFv (n=3), PbA+PBS (n=6), PbA+scFv (n=6). Os gráficos mostram média e desvio padrão (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

Na análise da soma de todos os escores os animais do grupo *P. berghei* - ANKA + scFv obtiveram pontuações acima de 17 em todas as avaliações, enquanto que os animais do grupo *P. berghei* - ANKA + PBS tiveram decréscimo de aproximadamente 5 pontos 7 horas antes da eutanásia e de mais de 5 pontos minutos antes da eutanásia, mostrando que o tratamento com scFv protegeu os animais dos sinais graves da malária. Ressalta-se aqui que quanto mais alta a pontuação menores são os sinais clínicos. Além disso considera-se que RMCBS de 10 ou menos caracterizam sinais de MC e de 5 ou menos os animais vão a óbito em 1-4 horas e portanto devem ser eutanasiados (CARROLL et. al, 2010).

Posição corporal, grooming, olhos (avaliação ocular) e desempenho motor, são avaliações que mostram principalmente sinais gerais de doença em camundongos, uma vez que estes animais passam, quando saudáveis, a maior parte do tempo ativo se limpando (cerca de 40%), seguido das atividades de andar/explorar a caixa e se alimentar (CHUMBINHO et. al, 2012; MAZE ENGINEERS, 2019). Assim, entendemos que os sinais de corpo encurvado, piloereção e diminuição da autolimpeza, fechamento e secreção ocular e diminuição da atividade exploratória, os quais se apresentaram nos dois grupos infectados e foram mais evidentes nos animais infectados-tratados com PBS, são esperados e são um mecanismo do organismo para diminuir o gasto de energia em situações de doença (IACUC, 2018). Apesar da presença desses sinais, obtivemos escores maiores nos animais do grupo *P. berghei* - ANKA + scFv, mostrando que o tratamento provocou melhora no quadro geral da doença.

Os demais escores são direcionados a avaliação do sistema nervoso central e periférico. Aqui não encontramos alterações na marcha, equilíbrio, força dos membros torácicos, escape ao toque, reflexos podais e de pinna dos animais infectados e tratados com scFv. Em contrapartida, os animais infectados e tratados com PBS apresentaram estes sinais de amplitudes moderadas a graves, especialmente no 6º dpi. Isso nos sugere que houve preservação da barreira hematoencefálica e do sistema nervoso central quanto a inflamação, formação de edema, hemorragias e hipóxia no grupo que recebeu scFv, pois estes eventos são responsáveis pelo aumento da pressão intracraniana e microlesões do tecido encefálico que levam aos sinais neurológicos da MC (GHAZANFARI, et. al, 2018; LUZOLO e NGOYI, 2019).

## 5. O tratamento com scFv melhora os quadros de trombocitopenia e de monocitopenia de animais infectados com *P. berghei* - ANKA



**Figura 5:** Os gráficos apresentam os parâmetros hematológicos de camundongos C57BL/6 infectados ou não com *P. berghei* - ANKA (PbA) e tratados com scFv ou PBS. Valores de referência baseados no mesmo modelo animal

da The Jackson Laboratory (JAX®). Grupos: PBS (n=3), scFv (n=3), PbA+PBS (n=6), PbA+scFv (n=6). Representação de média e desvio padrão (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001).

Os animais do grupo *P. berghei* - ANKA + PBS apresentaram policitemia, observada pelo aumento do hematócrito. Apesar de ser esperado um quadro de anemia nestes animais, não houve anemia evidente devido à desidratação severa verificada nos mesmos no dia da coleta, o que diminui o volume de líquidos circulantes e conseqüentemente aumenta a concentração de hemácias no sangue. Também foi observado MCHC aumentado, o que é um indicativo de hemólise, no entanto, para confirmação seria necessário fazer exame de bilirrubina indireta. Outros achados foram trombocitopenia, leucopenia por linfocitopenia e eosinopenia, neutrofilia com desvio para a direita e monocitose.

No grupo *P. berghei* - ANKA + scFv observou-se anemia normocrômica normocrômica, trombocitopenia, leucopenia por linfocitopenia e eosinopenia e neutrofilia com desvio para a direita. Esses achados são característicos de uma resposta aguda, pois há consumo dos leucócitos com aumento dos neutrófilos sem desvio à esquerda.

Na comparação do grupo *P. berghei* - ANKA + scFv em relação ao grupo *P. berghei* - ANKA + PBS houve diminuição importante da monocitose; aumento na contagem de plaquetas que, apesar de ainda estarem abaixo dos valores de referência tiveram melhora significativa (p < 0,001) e diminuição do MCHC, havendo possível diminuição de hemólise.

Um achado anômalo foi a presença de trombocitose no grupo PBS em relação aos valores de referência.

Observamos que os resultados do grupo controle infectado-não tratado são semelhantes aos achados do estudo de Kotepui et. al (2014), onde foram analisados os parâmetros hematológicos de 4985 pacientes humanos incluindo 703 destes infectados com malária. Tanto os camundongos do nosso estudo, quanto os humanos do estudo de Kotepui et. al apresentaram baixa contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos e aumento nas contagens de monócitos e neutrófilos. Outros estudos em humanos também encontraram as mesmas alterações semelhantes quanto a trombocitopenia, leucopenia, linfocitopenia e monocitose como demonstrado na Tabela 1. (BAKHUBAIRA, 2013; WARIMWE et. al, 2013; ULLAH et. al, 2018; AHAMED et. al, 2019).

**Tabela 1** - Parâmetros hematológicos de seres humanos e camundongos C57BL/6 com malária severa

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Malária em Humanos</b>	<b>Grupo PbA + PBS</b>
Hemácias	Anemia normocítica normocrômica com tendência a microcitose e hipocromia <sup>3,4,5</sup>	?
Plaquetas	Trombocitopenia <sup>2,3,4,5</sup>	Trombocitopenia <sup>1</sup>
Leucócitos totais	Leucopenia <sup>2,3,4</sup>	Leucopenia <sup>1</sup>
Basófilos	Sem alterações	Sem alterações <sup>1</sup>
Eosinófilos	?	Eosinopenia <sup>1</sup>
Monócitos	Monocitose <sup>2</sup>	Monocitose <sup>1</sup>
Neutrófilos	Neutrofilia <sup>2</sup>	Neutrofilia <sup>1</sup>
Linfócitos	Linfocitopenia <sup>2</sup>	Linfocitopenia <sup>1</sup>

Fonte: <sup>1</sup> KLEIN, S.G.; <sup>2</sup> KOTEPUI et. al, 2014; <sup>3</sup> ULLAH et. al, 2018; <sup>4</sup> BAKHUBAIRA, 2013; <sup>5</sup> AHAMED et. al, 2019.

Com base nesses achados entende-se que a MC é o resultado de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, que envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente ativação de células endoteliais, sequestro de eritrócitos parasitados, plaquetas e leucócitos, o que está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular, edema e hemorragias (NISHANTH & SCHLÜTER, 2019).

## 7 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível avaliar o potencial tratamento da malária cerebral com scFv anti-GPI de *Plasmodium falciparum* em modelo murino. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com scFv provocou aumento da sobrevivência, recuperação do peso corporal, diminuição da parasitemia, prevenção de sinais neurológicos e melhora em parâmetros hematológicos de camundongos infectados com *P. berghei* - ANKA em relação aos infectados e tratados com solução salina. Isto nos indica que o scFv selecionado é uma molécula promissora no tratamento da forma grave da malária. No entanto, para a comprovação de que é uma molécula segura, são necessários mais estudos afim de entender seu mecanismo de ação, efeitos sobre o hospedeiro e o parasito, farmacocinética, dentre outros fatores.

## **RECURSOS FINANCEIROS**

Para execução deste projeto, foram utilizados recursos financeiros e consumíveis disponibilizados através do projeto de pesquisa: “Desenvolvimento de modelos experimentais murinos através de indução de mutações gênicas.” Financiado pela Fundação de Apoio Universitário – FAU. Edital: CHAMADA PÚBLICA EDITAL FAU Nº 02/2018 - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO À PESQUISA. Ainda, contou com a infraestrutura das Rede de Biotérios de Roedores (REBIR), da Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) e do Laboratório de Nanobiotecnologia (NANO BIO) da UFU.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, Y. et. al. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 variants induce cell swelling and disrupt the blood–brain barrier in cerebral malária. **Journal of Experimental Medicine**, v. 2018, n. 3, p. e20201266, 2021.

AHAMED, A. M. et. al. Hematological Changes in Sudanese Patients with Falciparum Malaria Attending Elnihoud Teaching Hospital. **Sudan Journal of Medical Sciences**, 2019.

AHMAD, S.; et al. scFv antibody: Principles and clinical application. **Journal of Immunology Research**, v. 2012, 2012.

ATAIDE, B. J. A., et. al. Melatonin Prevents Brain Damage and Neurocognitive Impairment Induced by Plasmodium Berghei ANKA Infection in Murine Model of Cerebral Malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10:541624, 2020.

BAKHUBAIRA, S. Hematological Parameters in Severe Complicated Plasmodium falciparum Malaria among Adults in Aden. **Turkish Journal of Hematology**, v. 30, n. 4, p. 394-399, 2013.

BOPP, S. E. R. et al. Genome wide analysis of inbred mouse lines identifies a locus containing ppar- $\gamma$  as contributing to enhanced malaria survival. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

CAMARA, A. et. al. *Terminalia albida* treatment improves survival in experimental cerebral malaria through reactive oxygen species scavenging and anti-inflammatory properties. **Malaria journal**, v. 18, n. 431, 2019.

CARIOCO, Y. et. al. Ethanollic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1547, 2018.

CARNEIRO, A. P. et al. A putative OTU domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid cancer and identifies less-aggressive tumours. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 3, p. 551–558, 2014.

CARROLL, R. W. et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 1–12, 2010.

CHUMBINHO, L. C. et. al. Etograma de camundongos em biotério: quais são as principais atividades destes animais dentro da gaiola? **RESBCAL**, v.1, n.3, p. 255-262, 2012.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (Brasil).

Disponível

em:

<http://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html#:~:text=Resolu%C3%A7%C3%B5es%20Normativas%20do%20Concea&text=RESOLU%C3%87%C3%83O%20NORMATIVA%20N%C2%BA%202%2C%20DE,14%20DE%20JUNHO%20DE%202012>. Acesso em: 13 dez 2020.

DE OCA, M. M. et. al. Plasmodium berghei ANKA (PbA) Infection of C57BL/6J Mice: A Model of Severe Malaria. **Methods in Molecular Biology**, v. 1031, p. 203–213, 2013.

DE SOUZA, J. B. et al. Prevalence and boosting of antibodies to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols and evaluation of their association with protection from mild and severe clinical malaria. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5045–5051, 2002.

GHAZANFARI, N.; MUELLER, S. N.; HEATH, W. R. Cerebral malaria in mouse and man. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

GOWDA, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 596–604, 2007.

GRAMAGLIA, I. et. al. Citrulline protects mice from experimental cerebral malaria by ameliorating hypoargininemia, urea cycle changes and vascular leak. **Plos ONE**, v. 14, n. 3, p. e0213428, 2019.

GUN, S. Y. et al. Interferons and interferon regulatory factors in malaria. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

IACUC, American Association for Laboratory Animal Science. Clinical signs of pain and disease in laboratory animals, n. 4446, Yale University, 2018.

KOTEPUI, M. et al. Effect of malarial infection on haematological parameters in population near Thailand-Myanmar border. **Malaria Journal**, v. 13, n. 218, 2014.

LUZOLO, A. L. e NGOYI, D. M. Cerebral malária. **Brain Research Bulletin**, v. 145, p. 53-58, 2019.

MACKINTOSH, C. L.; BEESON, J. G.; MARSH, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 12, p. 597–603, 2004.

MAZE ENGINEERS. Mouse ethogram. **Conducts Science**, 2019. Acesso em: 15 mai 2021. Disponível em: <https://conductscience.com/maze/category/mouse-ethogram/>

MBENGUE, B. et al. Inflammatory cytokine and humoral responses to plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols correlates with malaria immunity and pathogenesis. **Immunity Inflammation and Disease**, v. 4, n. 1, p. 24–34, 2016.

MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil** - Versão Preliminar. [s.l: s.n.]. v. 1

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 1. ed. [s.l: s.n.].

NAIK, R. S. et al. Naturally elicited antibodies to glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of Plasmodium falciparum require intact GPI structures for binding and are directed primarily against the conserved glycan moiety. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1412–1415, 2006.

NISHANTH, G. e SCHLÜTER, D. Blood–Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 516-528, 2019.

OAKLEY, M. S. et al. Clinical and molecular aspects of malaria fever. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 442–449, 2011.

PASLOSKE, B. L. e HOWARD, R. J.. Malaria, the Red Cell, and the Endothelium. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 283-295, 1994.

PEARSON, R. D. **Malária**. 2020.

POTCHEN, M. J. et. al. Tesla Magnetic Resonance Imaging to Investigate Potential Etiologies of Brain Swelling in Pediatric Cerebral Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 497-504, 2018.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

SCHIESS, N. et al. Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2020.

SCHMIDT, K. E. et. al. Doxycycline inhibits experimental cerebral malaria by reducing inflammatory immune reactions and tissue-degrading mediators. **Plos One**, v. 13, n. 2, 2018.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 722–735, 2005.

SEYDEL, K. B. et. al. Brain Swelling and Death in Children with Cerebral Malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, p. 1126-1137, 2015.

THE JACKSON LABORATORY. **Physiological Data Summary - C57BL/6J (000664)**. Disponível em: [http://jackson.jax.org/rs/444BUH304/images/physiological\\_data\\_000664.pdf](http://jackson.jax.org/rs/444BUH304/images/physiological_data_000664.pdf). Acesso em: 20 abr 2021.

TORRE, S.; LANGLAIS, D.; GROS, P. Genetic analysis of cerebral malaria in the mouse model infected with *Plasmodium berghei*. **Mammalian Genome**, v. 29, n. 7–8, p. 488–506, 2018.

TRAMMELL, R. A. e TOOTH, L. A. Markers for Predicting Death as an Outcome for Mice Used in Infectious Disease Research. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 6, p. 492-498, 2011.

ULLAH, I. et. al. Hematological Profile of Patients Having Malaria-positive Peripheral Blood Smears: A Cross-sectional Study at a Diagnostic Research Center in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **Cureus**, v. 10, n. 9, p. e3376, 2018.

WANG, A., HUEN, S.C., LUAN, H.H., et al. Glucose metabolism mediates disease tolerance in cerebral malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, p. 11042-11047, 2018.

WARIMWE, G. M. et. al. The Ratio of Monocytes to Lymphocytes in Peripheral Blood Correlates with Increased Susceptibility to Clinical Malaria in Kenyan Children. **Plos ONE**, v. 8, n. 2, p. e57320, 2013.

WHITE, N. J. et al. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Treatment of Malaria**. v. 3, p. 281–284, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2019**. [s.l: s.n.].

WU, X. et. al. IL-4 Treatment Mitigates Experimental Cerebral Malaria by Reducing Parasitemia, Dampening Inflammation, and Lessening the Cytotoxicity of T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 1, p. 118-131, 2020.

ZHAO, S. et. al. Fenozyme Protects the Integrity of the Blood–Brain Barrier against Experimental Cerebral Malaria. **Nano Letters**, v. 19, n. 12, p. 8887-8895, 2019.

ZHOU, S. J. et al. Strategies for Bispecific Single Chain Antibody in Cancer Immunotherapy. **Journal of Cancer**, v. 17, p. 3689-3696, 2017.

**ANEXO 1 -Análise final da Comissão de Ética no Uso de Animais**

Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: ceua@propp.ufu.br; [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 028/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 153/16**

Projeto Pesquisa: "Busca por alvos imunes para o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas contra malária em modelo murino".

Pesquisador Responsável: Murilo Vieira Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de março de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU

