

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LUDMILLA SILVA MENDES

Caracterização do *Calomys callosus* como modelo experimental para o estudo da malária

Uberlândia-MG

2025

LUDMILLA SILVA MENDES

Caracterização do *Calomys callosus* como modelo experimental para o estudo da malária

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

Orientador: Matias Pablo Juan Szabó

Coorientador: Murilo Vieira da Silva

Uberlândia-MG

2025

LUDMILLA SILVA MENDES

Caracterização do *Calomys callosus* como modelo experimental para o estudo da malária.

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

Uberlândia, 2025

Banca Examinadora:

Matias Pablo Juan Szabó– Doutor (UFU)

Murilo Vieira da Silva– Doutor (UFU)

Flávia Batista Ferreira– Doutora (UFU)

Sandra Gabriela Klein– Mestra (UFU)

Dedico este trabalho à presença constante e invisível que me guiou com silêncio e força, mesmo nos momentos em que pensei em parar.

E aos meus pais, por todo amor incansável, pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim todos os dias.

Essa conquista é de vocês também!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, José Cardoso e Maria Rezende, que tornaram possível minha mudança de cidade para estudar, e que, mesmo diante das dificuldades, sempre me lembraram que a escolha foi minha. Por isso, cabia a mim lidar com os prós e contras do caminho que decidi seguir.

Agradeço ao meu namorado Luan, minha eterna gratidão por acreditar em mim, especialmente quando eu mesma tinha dúvidas.

Agradeço aos meus companheiros de jornada Ana Gabriela, Karlaine e Maria Dariana. Em especial a Maria, pois sem o incentivo dela eu nem teria tentado a vaga de iniciação científica no LABME.

Agradeço ao Professor Murilo, que me deu a oportunidade de conhecer um novo universo, que é a ciência de animais de laboratório, área pela qual eu me apaixono cada dia mais.

A Flávia, por confiar em mim e me dar a oportunidade de participar desse projeto além dos ensinamentos sobre camundongos e malária.

A Sandra que praticamente me adotou no laboratório e sempre buscou me ajudar, não importava qual fosse a dúvida.

A todos os companheiros do LABME, meu sincero agradecimento pelos momentos de aprendizado, descontração e celebração. Vocês são, sem dúvida, a melhor equipe de laboratório com quem já tive o prazer de trabalhar.

À equipe do corpo técnico da REBIR, agradeço o trabalho essencial que realizam, garantindo o bem-estar e a qualidade de vida dos animais.

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

Agradeço também aos próprios animais, cuja contribuição é fundamental para o avanço da ciência.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade, muito obrigada!

“Em vida, almejo celebrar a ciência coletivamente; a solidão, reservo para o meu túmulo.”

(Autoria própria)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida simplificado do <i>Plasmodium</i>	16
Figura 2: Roedores da espécie <i>Calomys callosus</i>	20
Figura 3: Fármacos associados ao Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> e epidemiologia da resistência aos medicamentos antimaláricos na África e no sudeste asiático.	23
Tabela 1. Parâmetros avaliados no escore RMCBS	28
Tabela 2. Parâmetros adaptados a partir do escore RMCBS	30
Figura 4: Delineamento experimental elaborado utilizando o software BioRender.	33
Figura 5: Escores de morbidade avaliados a partir da infecção de <i>Calomys callosus</i> com diferentes doses de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	35
Figura 6: Gráfico apresentando a curva de sobrevivência dos animais conforme os dias após a infecção.	37
Figura 7 - Parâmetros hematológicos de <i>Calomys callosus</i> após infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	40
Figura 9: Gráficos de porcentagem de parasitemia de roedores <i>Calomys callosus</i> infectados/ com <i>Plasmodium berghei</i> - ANKA (PbA).	43

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa parasitária causada pelo protozoário *Plasmodium* spp. transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*. Os sintomas variam conforme a espécie do *Plasmodium* e a idade do indivíduo infectado, que pode se apresentar assintomático ou pode evoluir para o quadro grave da doença, como a malária cerebral. Embora diversos estudos envolvam a anemia malárica e camundongos da linhagem BALB/c, sua patogênese quanto a utilização desses animais não está completamente elucidada. Roedores *Calomys callosus* são utilizados como modelo experimental no entendimento de doenças parasitárias como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Schistosoma mansoni*, desta forma, o objetivo deste trabalho é verificar a possibilidade do estabelecimento de um novo modelo experimental animal para estudar mecanismos da patogênese da malária utilizando roedores da espécie *C. callosus*. Durante o experimento, os animais foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA em diferentes doses e, avaliados quanto a parasitemia, escore de morbidade e peso corporal. Além disso, os animais infectados foram posteriormente eutanasiados para coleta de material para análises hematológicas. Os resultados obtidos revelaram que os animais infectados com 1×10^7 hemácias parasitadas apresentaram maior índice de parasitemia quando comparados com as outras dosagens. Além disso, nos grupos de dose 1×10^7 os parâmetros marcha, higiene, equilíbrio e peso mostraram-se alterados. As análises hematológicas nos grupos de dose 1×10^7 revelaram neutrofilia, trombocitopenia, anisocitose e redução do hematócrito de forma mais acentuada quando comparado aos outros grupos. A curva de sobrevivência indicou menor sobrevivência nos grupos infectados com 1×10^7 . Os resultados obtidos indicam a eficácia do modelo experimental utilizado e evidenciam seu potencial para pesquisas futuras. No entanto, são necessários estudos complementares para confirmar esses achados e investigar outras variáveis relacionadas ao curso da infecção.

Palavras-chave: Modelo Experimental, *Plasmodium berghei*, Malária, *Calomys callosus*.

ABSTRACT

Malaria is an infectious parasitic disease caused by the protozoan *Plasmodium* spp., transmitted by the female *Anopheles* mosquito. Symptoms vary according to the *Plasmodium* species and the age of the infected individual, who may remain asymptomatic or progress to severe forms of the disease, such as cerebral malaria. Although several studies involve malarial anemia and BALB/c mice, its pathogenesis regarding the use of these animals is not yet fully elucidated. *Calomys callosus* rodents have been used as experimental models for the study of parasitic diseases such as *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, and *Schistosoma mansoni*. Therefore, the aim of this study is to investigate the possibility of establishing a new experimental animal model to study the mechanisms of malaria pathogenesis using *C. callosus* rodents. During the experiment, the animals were infected with *Plasmodium berghei* ANKA at different doses and evaluated for parasitemia, morbidity score, and body weight. Additionally, the infected animals were later euthanized for the collection of material for hematological analyses. The results obtained revealed that animals infected with 1×10^7 parasitized red blood cells showed higher parasitemia levels compared to the other dosage groups. Moreover, in the 1×10^7 dose groups, the parameters of gait, grooming, balance, and weight were altered. Hematological analyses in the 1×10^7 groups showed neutrophilia, thrombocytopenia, anisocytosis, and a more pronounced reduction in hematocrit compared to the other groups. The survival curve indicated lower survival rates in the groups infected with 1×10^7 . These results demonstrate the effectiveness of the experimental model used and highlight its potential for future research. However, further studies are necessary to confirm these findings and to investigate other variables related to the course of infection.

Keywords: Experimental Model; *Plasmodium berghei* ANKA; Malaria; *Calomys callosus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Ciclo de vida do parasita	15
Figura 1: Ciclo de vida simplificado do <i>Plasmodium</i>	16
2.3 Modelo experimental murino para malária	18
2.4 Modelo experimental <i>Calomys callosus</i>	20
Figura 2: Roedores da espécie <i>Calomys callosus</i>	20
3. OBJETIVOS	21
4. JUSTIFICATIVA	22
Figura 3: Fármacos associados ao Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> e epidemiologia da resistência aos medicamentos antimaláricos na África e no sudeste asiático.	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Animais e comissão de ética.....	26
5.2 Condições de alojamentos dos animais	26
5.3 Manutenção da cepa do parasito.....	27
5.4 Delineamento experimental.....	27
5.5 Infecção	28
5.6 Avaliação do escore de morbidade e estabelecimento de ponto final humanitário.....	28
Tabela 1. Parâmetros avaliados no escore RMCBS	28
Tabela 2. Parâmetros adaptados a partir do escore RMCBS.....	30
5.7 Análise de parasitemia.....	32
5.8.1 Estabelecimento do ponto final humanitário.....	32
5.8.2 Coleta de material biológico.....	33
5.9 Análise estatística	33
Figura 4: Delineamento experimental elaborado utilizando o software BioRender.....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1 O modelo <i>Calomys callosus</i> se apresentou eficaz para a infecção de <i>Plasmodium berghei</i>	34
Figura 5: Escores de morbidade avaliados a partir da infecção de <i>Calomys callosus</i> com diferentes doses de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	35
6.2 - Os animais infectados com 1×10^7 hemácias parasitadas apresentaram menor taxa de sobrevivência.....	36
Figura 6: Gráfico apresentando a curva de sobrevivência dos animais conforme os dias após a infecção.	37
6.3 - Alterações hematológicas compatíveis com anemia foram observadas nos animais após a infecção.....	37
Figura 7 - Parâmetros hematológicos de <i>Calomys callosus</i> após infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	40

6.4 - Após a infecção os animais apresentaram perda de peso corporal.	42
6.5 Análise de parasitemia.....	43
Figura 9: Gráficos de porcentagem de parasitemia de roedores <i>Calomys</i> callosus infectados/ com <i>Plasmodium berghei</i> - ANKA (PbA).	43
7. CONCLUSÃO.....	46
8. ORÇAMENTO	46
Referências	448

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária antiga, sendo apontada como a principal causa de morte entre os primatas precursores do *Homo sapiens* (Bruce et al., 1988). Por estar muito relacionada à sua incidência em locais onde há pouco saneamento básico e populações de baixa escolaridade, por vezes é considerada erroneamente “doença de pobre” (França et al., 2008). Contudo a relação da doença com a humanidade data de muitos anos, com relatos advindos desde 2.700 a.C. onde o Cânone Chinês de medicina, Nei Ching, já discutia sintomas da malária e as relações entre febres e melancolias prolongadas, diversos relatos de filósofos famosos como Homero, Aristóteles, Platão, Sócrates, Horácio e Pepys, sugerem febres relacionadas à malária (Bruce et al., 1988).

O termo malária deriva do italiano onde era chamada de “ária cattiva ou mal’aria” (ar ruim) no século XIV este termo entrou para a língua inglesa em torno de 200 anos depois (França et al., 2008). Relatos históricos sugerem que por volta de 323 a.C. o general Macedônio Alexandre o Grande tenha contraído a febre maligna, onde morreu com 33 anos de idade. (Howard et al., 1999) Napoleão utilizou da malária como arma biológica em uma expedição contra os britânicos em Walcheren, de modo intencional. Napoleão inundou o interior da Holanda o que permitiu a disseminação da malária, “Não vamos oferecer resistência aos ingleses além da febre que logo vai devorá-los” foi a frase dita pelo general francês. Ao fim da expedição que terminou por volta de 1810, a febre havia eliminado mais de 40% dos homens envolvidos no combate (Howard et al., 1999).

A malária está presente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, de 1900 a 2000, por volta de 300 milhões de pessoas morreram devido à doença, o que representa cerca de 5% das mortes registradas (Carter e Mendis et al., 2002). Conforme descrito no último relatório mundial sobre malária da OMS, estima-se que em 2023 ocorreram 263 milhões de casos, cerca de 11 milhões de casos a mais em 2023 em comparação com 2022. O número estimado de mortes em 2023 foi de 597.000 de mortes por malária em todo o mundo em comparação com 600.000 em 2022 (WHO, 2024).

A ocorrência da doença se dá principalmente em nações com clima tropical e recursos escassos como a África Subsaariana, Sudeste Asiático e na Amazônia (Feachem et al., 2019). As mudanças climáticas têm impactado o equilíbrio hídrico e favorecido o surgimento de surtos de doenças tropicais transmitidas por insetos, como o *Anopheles*. O aquecimento global tem contribuído para a ocorrência de eventos climáticos extremos, como o El Niño, que alteram a

dinâmica populacional desses vetores, o que pode estar associado ao aumento nos casos de infecções por doenças tropicais (Téllez et al., 2004).

Na América do Sul o Brasil lidera o ranking de maior incidência de malária (Greenwood et al., 2022). O incentivo de órgãos governamentais quanto a ocupação desordenada da região amazônica, a construção de usinas hidrelétricas, a instalação de garimpos e o desenvolvimento de projetos agropecuários provocaram um crescimento consistente na transmissão da malária nessa região que persiste até os dias atuais (França et al., 2008; Barata, 1995). A prevalência de casos de malária se concentra na região amazônica e os rios desempenham um papel importante no ciclo de vida da doença (Fonseca et al., 2023), uma vez que o vetor se reproduz em ambientes aquáticos. Um fator importante para a propagação do mosquito está relacionado a coloração dos rios em que esse vetor se multiplica, segundo Fonseca et al., (2023), a distribuição da malária está relacionada com a coloração dos rios, onde, locais localizados próximos a rios de águas negras apresentam maior incidência de malária quando comparados a locais às margens de rios de águas brancas.

A transmissão da malária ocorre através da picada de fêmeas do mosquito *Anopheles* (WHO, 2024; Balaji et al., 2020; Ghazanfari et al., 2018). Durante o repasto sanguíneo, esses mosquitos inoculam os parasitas do gênero *Plasmodium* na corrente sanguínea do hospedeiro humano, dando início ao ciclo de infecção (WHO, 2024; Balaji et al., 2020; Ghazanfari et al., 2018). A malária grave pode se manifestar por diferentes síndromes clínicas, influenciadas tanto pelas características do hospedeiro quanto pelas propriedades do parasita (Lamikanra et al., 2007). Em crianças pequenas, a anemia malárica grave é a síndrome mais prevalente entre os casos graves da doença, desempenhando um papel significativo na elevada taxa de mortalidade e morbidade associada à malária (Lamikanra et al., 2007). A anemia malárica é uma complicação da infecção por *Plasmodium falciparum*, uma das espécies de parasita que causa a malária em humanos. Essa condição ocorre devido ao aumento da hemólise das hemácias infectadas, à remoção acelerada de hemácias não infectadas (RBCs) e à incapacidade do hospedeiro de gerar uma resposta eritroide eficaz para compensar a perda celular (Lamikanra et al., 2007; Jones et al., 2002).

Embora os estudos sobre a patogênese da malária humana estejam em andamento, ainda existem lacunas significativas na compreensão dessa condição (Simwela et al., 2022; Ghazanfari et al., 2016). O estudo da anemia malárica despertou interesse acadêmico e profissional de forma relativamente tardia (Rowe, 2006). No entanto, a anemia malárica grave representa uma preocupação significativa como um grave problema de saúde pública, devido

ao grande número de crianças afetadas, com a possibilidade de aumento desses casos à medida que a resistência aos medicamentos se dissemina (Ekvall et al., 2003; Trape et al., 2001). Por trás disso, a complexidade dessa interação entre parasita, mosquito vetor e hospedeiro humano são alguns dos desafios para o controle e erradicação da doença em todo o mundo (Newton et al., 1998; Simwela et al., 2022). Desde o princípio, pesquisas laboratoriais de malária se baseiam em modelos animais que servem como modelos experimentais para a infecção humana, envolvendo tanto o estudo básico da morfologia dos parasitas, a sua capacidade patogênica quanto o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas (Simwela et al., 2022). As descobertas recentes de modelos experimentais murinos envolvendo a malária humana permitem a compreensão da fisiopatologia da malária o que possibilita o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Ghazanfari et al., 2016).

A malária experimental é estudada por meio de diversas linhagens de camundongos infectados com diferentes cepas de *Plasmodium*, específicas para roedores, que levam ao desenvolvimento da malária murina (Ghazanfari et al., 2016). Dentre as principais espécies de *Plasmodium* que causam infecção em camundongos, destacam-se *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. vinckei* (Lamikanra et al., 2007). O uso de modelos murinos na pesquisa sobre a malária é favorecido pela disponibilidade de linhagens consanguíneas com diferentes graus de suscetibilidade, permitindo a distinção entre infecções letais e não letais (Lamb et al., 2006). O curso da infecção e a resposta imunológica variam conforme a combinação hospedeiro-parasita, mas invariavelmente resultam em anemia (Lamikanra et al., 2007). No entanto, ainda existem lacunas no entendimento da patogênese da infecção nesses modelos.

Dessa forma, *Calomys callosus* surge como um potencial modelo alternativo e complementar para o estudo da malária. Essa espécie de roedor, pertencente à família Cricetidae e originária da América do Sul, compartilha semelhanças anatômicas e fisiológicas com os camundongos, facilitando sua utilização em estudos experimentais (Rosa et al., 2022; Mello et al., 1979). O roedor *C. callosus* é um modelo experimental em ascensão, em ambiente laboratorial já se demonstrou eficaz no estudo de várias doenças, dentre elas, pode-se citar: toxoplasmose (Franco et al., 2014), doença de chagas (Santos et al., 2008), esquistossomose (Lenzi et al., 2002), leishmaniose (Mello et al., 1984). Modelos experimentais animais podem oferecer informações valiosas quanto a mecanismos e possíveis inovações de tratamento contra a malária (Craig et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciclo de vida do parasita

A Malária é uma doença ocasionada por protozoários do filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium* transmitida através da picada de um mosquito fêmea pertencente ao gênero *Anopheles* (WHO, 2024; Balaji et al., 2020; Ghazanfari et al., 2018). O *Plasmodium* se aloja no interior da glândula salivar do mosquito, que ao se alimentar do hospedeiro intermediário, durante a fase de repasto sanguíneo a fêmea do mosquito transmite o parasito, em sua fase de esporozoítos que, ao serem inoculados no hospedeiro, migram em direção ao fígado onde infectam hepatócitos (Balaji et al., 2020; Dumarchey et al., 2022).

O parasita então inicia o processo de esquizogonia que pode ser dividida em duas fases, fase hepática ou esquizogonia pré-eritrocítica e fase eritrocítica ou esquizogonia eritrocítica (Ghazanfari et al., 2018; Balaji et al., 2020; Newton et al., 1998). Dentro do fígado, nos hepatócitos ocorre a fase assexuada. Os parasitas então se transformam em esquizontes, os esquizontes produzem merozoítos imaturos e posteriormente se tornam maduros, quando isso acontece os merozoítos caem na corrente sanguínea onde irão infectar os eritrócitos e então começar o processo de multiplicação. Dentro das hemácias os merozoítos passam por diversos estágios como trofozoítos e esquizontes. Ao alcançar o estágio de esquizonte maduro dentro do eritrócito onde possui cerca de 16 a 24 merozoítos ocorre a saída novamente da hemácia para começar um novo ciclo, produzido o rompimento das hemácias e por consequência sintomas clínicos como anemia e apatia (Balaji et al., 2020). Além desse ciclo de infecção de hemácias, os trofozoítos também podem se desenvolver para gametócitos, que podem ser novamente ingeridos pelo mosquito *Anopheles* caso ele sugue o sangue de uma pessoa infectada (Ghazanfari et al., 2016; Balaji et al., 2020; Newton et al., 1998).

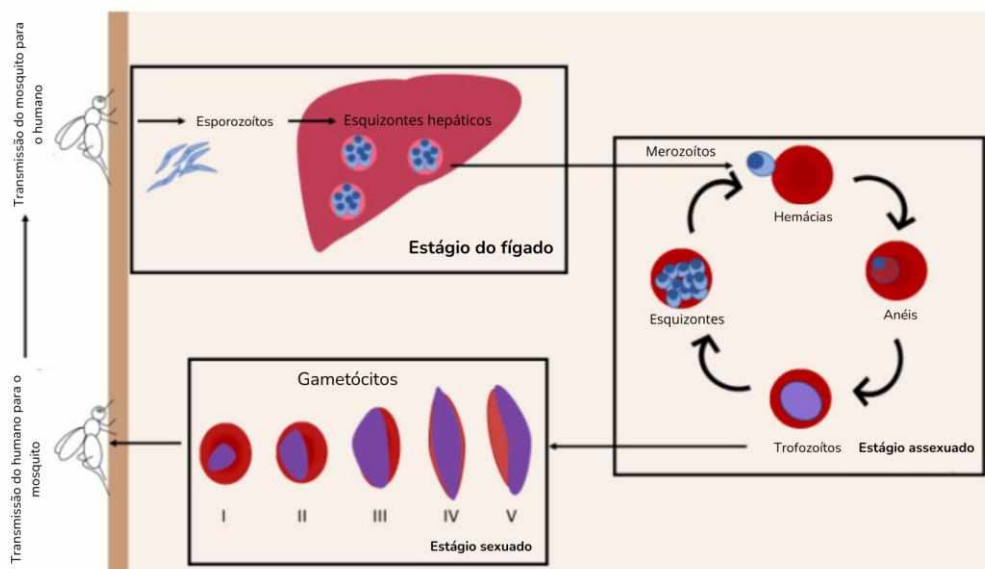
No mosquito, localizado em seu estômago ocorre a etapa de esporogonia, que corresponde à reprodução sexuada do parasita, iniciando-se com a diferenciação dos gametócitos em gametas e sua posterior fusão, que dá origem ao zigoto. O zigoto se transforma em uma forma móvel chamada de oocineto, que migra até a parede do intestino médio do inseto, onde se desenvolve em um oocisto (CENEPI, 2005). No interior desse oocisto, ocorre a formação dos esporozoítos. A duração do ciclo esporogônico varia de acordo com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura ambiente, levando, em geral, de 10 a 12 dias para ser concluído. Após sua formação, os esporozoítos são liberados na hemolinfa do mosquito e

migram até as glândulas salivares, de onde serão transmitidos ao hospedeiro humano no momento da picada (CENEPI, 2005).

Quatro espécies de *Plasmodium* infectam humanos, *P. ovale*, *P. Malarie*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as duas últimas as mais prevalentes (Carter e Mendis et al., 2002; Dumarchey et al., 2022). Os sintomas clínicos da malária aparecem durante a fase eritrocítica dos parasitas da malária (Balaji et al., 2020). No geral, a malária pode acarretar sintomas como febre, calafrios, dor de cabeça, vômito, anorexia, fadiga, diarreia e anemia. No entanto, a forma grave da doença, pode provocar um quadro de anemia grave, além de pequenos coágulos que podem gerar trombozes e embolias em diversos órgãos do corpo além de ocasionar a malária cerebral responsável por grande parte das mortes ocasionadas pela doença (Carter e Mendis et al., 2002; Ghazanfari et al., 2016; Newton et al., 1998).

Figura 1: Ciclo de vida simplificado do *Plasmodium*.

Durante o momento da alimentação, as fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles* inoculam esporozoítos nos seres humanos. Estes esporozoítos viajam até o fígado, onde se reproduzem ao longo de vários dias, dando origem a merozoítos que são liberados na corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos, passando por estágios de desenvolvimento que vão desde trofozoítos imaturos, comumente denominados de “anéis” até trofozoítos maduros e esquizontes (estágios assexuados). Uma pequena proporção desses parasitas se transforma em gametócitos (estágios sexuais). Os gametócitos passam por cinco estágios morfológicos (I-V), sendo que os estágios I-IV ficam retidos na medula óssea, enquanto o estágio V é liberado na corrente sanguínea periférica, tornando possível a transmissão para os mosquitos.



Fonte: Figura adaptada de Dumarchey et al., 2022.

2.2 Patogenia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a anemia malárica grave como níveis de hemoglobina (Hb) inferiores a 5,0 g/dL ou hematócrito abaixo de 15%, na presença de qualquer grau de parasitemia (Perkins et al., 2011). A anemia malárica grave é um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento, contribuindo para 3% a 46% das mortes pediátricas em unidades de referência (Perkins et al., 2011). Apesar dos esforços para reduzir sua incidência, a anemia malárica grave continua sendo uma das principais causas de morbidade infantil na África Subsaariana (Milner, 2018). Estudos em áreas endêmicas da região mostram que a taxa anual de hospitalização por anemia malárica grave é de 7,6 por 1.000 crianças menores de cinco anos, com uma taxa de letalidade de 9,7% (Perkins et al., 2011).

A anemia é uma complicação frequente tanto na malária aguda quanto na crônica. Em casos extremos, a infecção aguda em indivíduos com deficiência grave de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) pode ser exacerbada pelo uso de fármacos como a quinina, levando à hemólise intravascular severa, anemia grave e insuficiência renal aguda (Wickramasinghe & Abdalla, 2000). No outro extremo, pacientes com infecção crônica podem apresentar sintomas leves, como calafrios, esplenomegalia e anemia moderada. Entre esses dois extremos, a anemia malárica pode se manifestar em diferentes graus, sendo causada por diversos mecanismos fisiopatológicos (Wickramasinghe & Abdalla, 2000; Milner, 2018).

A gravidade da anemia na malária varia conforme o contexto. Em adultos saudáveis acometidos por *Plasmodium vivax*, a anemia pode ser leve e rapidamente resolvida com tratamento adequado. No entanto, em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a infecção pode se tornar fatal devido à hemólise induzida por medicamentos. Em regiões endêmicas, a infecção crônica, frequentemente associada a outros fatores, é a principal causa de anemia grave. Crianças menores de dois anos em áreas de alta transmissão estão entre os grupos mais vulneráveis à anemia malárica grave (Ghosh et al., 2007; Milner, 2018).

Os mecanismos fisiopatológicos que levam à anemia malárica ainda não são completamente compreendidos. Evidências sugerem que a desregulação da resposta imune, incluindo a interação entre monócitos e linfócitos na presença de hemozoína, pode interferir na regulação da eritropoietina por meio da interleucina-6 (IL-6), da proteína inflamatória 1-alfa de macrófagos e de moléculas expressas por células T ativadas. Além disso, a remoção acelerada de eritrócitos pelo baço, tanto de células parasitadas quanto de eritrócitos íntegros, também tem sido apontada como um fator contribuinte para o desenvolvimento da anemia malárica (Milner, 2018).

2.3 Modelo experimental murino para malária

Camundongos são amplamente utilizados na ciência para estudar e modelar doenças humanas (Simwela et al., 2022). Em roedores quatro cepas de malária estão presentes em grande parte dessas pesquisas sendo elas: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, essas espécies de parasitas compartilham uma sintonia genética cromossômica altamente conservada com o *P. falciparum* que infecta humanos (Simwela et al., 2022).

O modelo experimental BALB/c infectado através da cepa *P. chabaudi* pode ser utilizado na investigação da anemia causada pela malária, onde pode se observar se a ocorrência da destruição de hemácias por parasitas é responsável ou não, pela gravidade da condição de anemia no animal (Lamb et al., 2008).

O camundongo BALB/c é amplamente utilizado como modelo experimental no estudo da malária não complicada devido à sua resposta imunológica característica e à suscetibilidade a infecções por *Plasmodium*, especialmente por espécies adaptadas, como *Plasmodium berghei* e *Plasmodium yoelii*. Esse modelo permite a investigação de mecanismos imunopatológicos, a avaliação de respostas vacinais e a análise da eficácia de novos antimaláricos, fornecendo dados relevantes para a compreensão da interação patógeno-hospedeiro (Evans et al., 2006).

A manifestação da doença no hospedeiro varia conforme a cepa utilizada para a infecção. Por exemplo, a infecção por *Plasmodium yoelii* demonstrou ser não letal em BALB/c, apresentando o sequestro de glóbulos vermelhos infectados nos vasos cerebrais (Salmon, 1997). Em contraste, a infecção pela cepa *P. berghei* resultou em um quadro crônico e letal, porém sem o desenvolvimento de síndrome cerebral (Evans et al., 2006). Em um estudo que avaliou o

comportamento da cepa *P. berghei* em seis modelos experimentais distintos, observou-se que o estágio de anemia se manifestava por volta do sexto dia pós-infecção (Eling et al., 1977).

Os sintomas apresentados pelos animais após a infecção variam conforme o modelo experimental e a cepa utilizada. Em infecções por *P. berghei* em camundongos BALB/c, foram descritos sinais clínicos como isolamento, disfunção térmica, respiração intensa e acelerada, aumento da frequência cardíaca, postura encurvada, pelagem eriçada, olhos lacrimejantes ou fechados e relutância em se mover em estágios de alta parasitemia. Além disso, foram observadas dificuldades na locomoção, descoloração das orelhas, anemia e alteração da coloração do sangue, que passou de vermelho-escuro para um tom mais claro ou fulvo, acompanhada por uma redução significativa no número de hemácias (Dehghan et al., 2018).

Os modelos experimentais murinos para malária apresentam diversas vantagens, incluindo facilidade de manuseio, possibilidade de tratar todos os estágios do ciclo de vida do parasita em condições de laboratório e acesso a uma ampla variedade de ferramentas para manipulação genética (Simwela et al., 2022).

2.4 Modelo experimental *Calomys callosus*

O modelo experimental *C. callosus* é uma espécie de roedor que pertence à família Cricetidae, proveniente da América do Sul e tem tamanho semelhante aos camundongos (Rosa et al., 2022). No Brasil a espécie foi observada ao ar livre entre os períodos de junho a novembro, entre as estações de seca e colheita agrícolas (Mello et al., 1979). Segundo Mello (1984), “*C. callosus* tem forma murina delicada e elegante”, sua introdução como modelo experimental ocorreu em 1967 por Petter, por ser um animal de fácil manejo, alta produtividade, longa atividade reprodutiva e resistência a infecções comuns em animais de laboratório, somando-se a isso, os animais apresentam tamanho corporal reduzido, o que permite seu alojamento em pequenos espaços (Rosa et al., 2022; Mello et al., 1979).

Devido à sua utilização em laboratórios, *C. callosus* tem seu comportamento, fisiologia e anatomia bem conhecidos, tornando-o uma escolha promissora como modelo experimental para diversas doenças infecciosas (toxoplasmose, doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose), onde é utilizado para estudar tanto os mecanismos das mesmas quanto possíveis terapias (Rosa et al., 2022).

Figura 2: Roedores da espécie *Calomys callosus*.



Fonte: Klein, 2023.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estabelecer um novo modelo experimental animal para estudar mecanismos da patogênese da malária utilizando roedores da espécie *C. callosus*.

Objetivos específicos

- Determinar a partir da curva de sobrevida e parasitemia a menor carga parasitária de *P. berghei* ANKA capaz de desenvolver sinais de malária em roedores *C. callosus*;
- Analisar parâmetros clínicos a partir de escores de morbidade de animais infectados com *P. berghei* ANKA;
- Analisar alterações hematológicas com base nos resultados de hemogramas de animais infectados com *P. berghei* ANKA;
- Traçar curva de sobrevida a partir de infecção de animais infectados com *P. berghei* ANKA;
- Avaliar a replicação parasitária em resposta a diferentes doses de carga parasitária de *P. berghei* ANKA em animais infectados com *P. berghei* ANKA;

4. JUSTIFICATIVA

O tratamento precoce da malária causada pelo *P. falciparum* é fundamental na prevenção da progressão para doença grave e com risco de vida (Newton et al., 1998), em concomitância a malária, *P. falciparum* tem se tornado cada vez mais refratária a antimaláricos, que por sua vez aumentam a probabilidade de doença grave (Newton et al., 1998). Atualmente o tratamento para malária grave engloba a administração de antimaláricos em conjunto com o tratamento paliativo das complicações decorrentes da doença como, anemia, hipoglicemia, convulsões e outros acometimentos que a doença pode causar (Newton et al., 1998). Por vezes o tratamento antimalárico não está disponível no atendimento primário da saúde o que leva a população a tentarem terapias extra medicinais, seja pela falta de dinheiro ou pela cultura de curandeiros, porém por vezes a administração dos antimaláricos pode definir o curso da doença entre a sua resolução ou a progressão para uma doença grave e a morte (Newton et al., 1998).

Em humanos a sintomatologia da malária varia significativamente conforme a idade do indivíduo, onde pode se apresentar de doença assintomática a uma doença grave e letal, nesse aspecto a anemia malárica grave está entre uma das complicações mais relevantes da infecção por malária, caracterizando-se por uma redução significativa na contagem de hemácias devido a múltiplos fatores. Entre os mecanismos envolvidos, destacam-se a destruição direta das hemácias infectadas pelo parasita, a hemólise de células não parasitadas em consequência de alterações metabólicas e imunológicas, e a supressão da eritropoiese na medula óssea (Lamb et al., 2006). Processos imunomediados, como a ativação de citocinas pró-inflamatórias e a produção de autoanticorpos, também desempenham papel crucial no agravamento da anemia (Lamb et al., 2008). A compreensão detalhada desses mecanismos, é essencial para o desenvolvimento de terapias inovadoras e eficazes, com o objetivo de minimizar o impacto desta síndrome sobre os pacientes acometidos pela malária (Lamb et al., 2008).

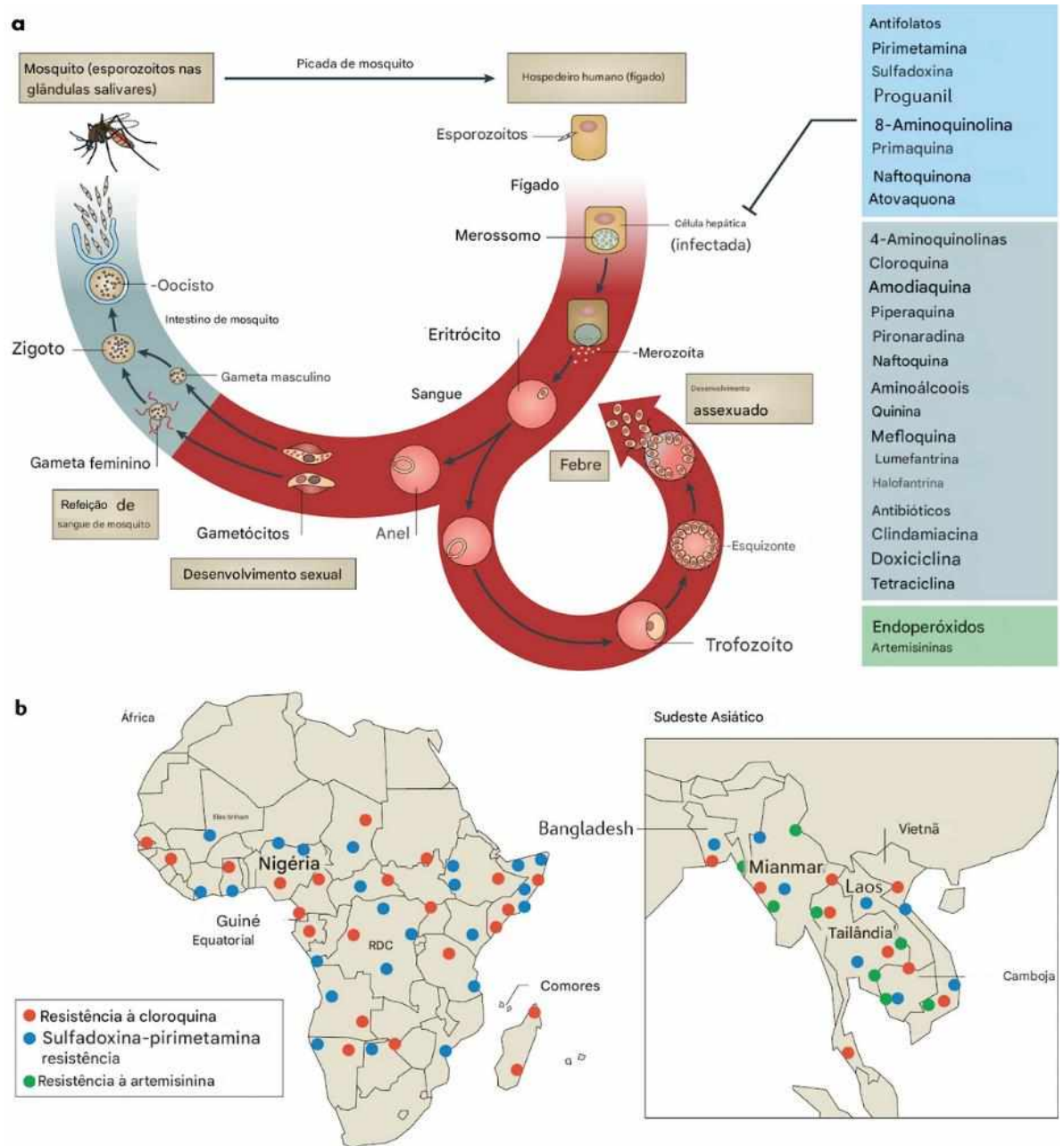
Os achados recentes de modelos experimentais murinos relacionados à malária humana ampliam a compreensão da fisiopatogenia da doença, possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Ghazanfari et al., 2016; Craig et al., 2012). A importância de buscar novos modelos experimentais para o estudo da malária é enfatizada pela crescente resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos convencionais (Newton et al., 1998). A resistência à drogas clássicas como a cloroquina, o fansidar (uma combinação de pirimetamina e sulfadoxina) e a quinina vêm sendo amplamente documentada, levando à necessidade

constante de desenvolvimento e uso de novos esquemas terapêuticos (UWIMANA et al., 2020). Na década de 60, as expectativas quanto a erradicação da malária com a cloroquina foram frustradas quando surgiram relatos de recidivas de algumas cepas de *Plasmodium falciparum* em áreas onde a droga era utilizada em larga escala. A partir disso, em 1961, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a resistência de cepas de *Plasmodium* à cloroquina o que gerou estímulo à produção de novos fármacos (Sá et al., 2011).

A resistência do *Plasmodium* a medicamentos antimaláricos está relacionada a mutações em genes do *Plasmodium* spp, como o *pfprt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) e *pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multi-drug resistance 1), que alteram o transporte intracelular da droga, reduzindo a eficácia da mesma (Haldar et al., 2018). O gene que codifica a proteína PfKelch13 (*Plasmodium falciparum* Kelch 13), localizado no cromossomo 13, foi identificado como o principal marcador de resistência à artemisinina. PfKelch13 é previsto como regulador da qualidade proteica, pertencendo a uma família gênica evolutiva eucariótica com cerca de 60 membros (Haldar et al., 2018).

Figura 3: Fármacos associados ao Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* e epidemiologia da resistência aos medicamentos antimaláricos na África e no sudeste asiático.

a) Em geral as classes de medicamentos antimaláricos atuais têm como alvo os estágios assexuados de trofozoíta e esquizonte. A primaquina é o único medicamento que atua sobre a latência hepática, prevenindo a infecção recorrente característica do *Plasmodium vivax*. Antifolatos, primaquina (8-aminoquinolina) e atovaquona (naftoquinona) também têm como alvo os parasitas na fase hepática. Endoperóxidos (como as artemisininas) têm como alvo todos os estágios assexuados e os estágios sexuais sanguíneos iniciais. b) Mapas detalhados mostram a distribuição da resistência de *P. falciparum* à cloroquina, à sulfadoxina–pirimetamina e à artemisinina na África e no sudeste asiático. A resistência à artemisinina é baseada em dois critérios: depuração (clearance) e mutação associada ao gene PfKelch13. Embora a mutação A578S tenha sido relatada, até o momento nenhuma mutação de *pfkelch13* associada à resistência foi registrada em Bangladesh (a resistência é indicada na fronteira Bangladesh–Mianmar). A resistência à cloroquina e à sulfadoxina–pirimetamina (mas não à artemisinina) surgiu na bacia amazônica da América do Sul (não mostrada). A resistência de *P. vivax* à cloroquina está surgindo (também não mostrada). Cada ponto representa uma região onde a resistência a medicamentos surgiu.



Fonte: Figura adaptada de Haldar et al., 2018

No geral, o *Plasmodium* spp. possui resistência a todos os antimaláricos conhecidos. O rastreamento quanto a sensibilidade aos medicamentos em infecções clínicas é essencial para orientar estratégias terapêuticas e políticas de administração em massa, visando a eliminação da malária. A Organização das Nações Unidas (ONU), através da Agenda 2030, estabeleceu o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3, que visa garantir uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, incluindo a erradicação de doenças como a malária. A meta 3.3, especificamente, propõe acabar com as epidemias de malária até 2030 (ONU, 2015).

Desse modo, o desenvolvimento de um modelo experimental a partir da utilização do *C. callosus* se destaca como uma opção promissora. Esses animais podem vir a auxiliar na compreensão da malária e no desenvolvimento de futuras terapias ou até mesmo a cura da doença. Além disso, a busca por modelos que respondem melhor à fisiopatologia da doença contribui para a redução do número de animais utilizados na experimentação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e comissão de ética

Roedores *C. callosus* machos e fêmeas com idade entre 7-8 semanas, foram utilizados como modelo experimental para o estudo da infecção por *P. berghei* ANKA. Os animais estavam acomodados no Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). Todos os procedimentos que envolvem animais foram devidamente autorizados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), conforme protocolo de aprovação, nº 23117.074819/2023-04. Todas as práticas de manejo e cuidados com o bem-estar animal ocorreram conduzidas em estrita conformidade com as diretrizes estipuladas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo suas resoluções normativas e orientações técnicas (CONCEA, 2023).

5.2 Condições de alojamentos dos animais

Os animais foram alojados em micro isoladores, próprios para a espécie e receberam como cama, maravalha de *Pinus eliotti*, autoclavada, posicionados em *Racks* ventilados. A água foi filtrada e esterilizada por radiação UV e a ração autoclavada, ambas fornecidas sem restrição (*ad libitum*). Os mesmos foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas respectivamente, em sala com controle de temperatura e umidade ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $55\% \pm 5\%$). A troca dos animais foi realizada semanalmente. No micro isolador a entrada de ar e a exaustão são filtradas por filtro HEPA, isolando o animal do macroambiente. Ademais, em cada micro isolador estavam alojados no máximo 5 animais por recinto.

Além disso, é importante destacar que um programa de enriquecimento ambiental foi aplicado em todos os alojamentos durante todo o período do experimento. Essa prática tem se mostrado fundamental para o bem-estar de animais de laboratório, especialmente para o modelo *Calomys callosus*, conforme ressaltado por Klein et al. (2024), “um protocolo de enriquecimento ambiental é essencial para testar modelos experimentais porque preserva o bem-estar animal, está alinhado com princípios éticos na experimentação animal e reduz o número de animais necessários”.

A REBIR dispõe de um protocolo de enriquecimento ambiental para seus animais, o qual foi adotado e utilizado neste experimento. Adicionalmente, todos os micro isoladores

possuíam iglus permanentes que os roedores utilizavam como abrigo para se acomodar e expressar comportamentos naturais.

5.3 Manutenção da cepa do parasito

A cepa foi armazenada em ultra-freezer (-80°C) e descongelada para realizar passagens por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6. Após a conclusão da segunda passagem, amostras de sangue foram coletadas da cauda dos camundongos infectados, sendo realizado um esfregaço sanguíneo para a contagem de hemácias infectadas em estágio de anel (trofozoítos imaturos). As concentrações de parasitos em sangue infectado utilizado foram ajustadas de acordo com os experimentos realizados no projeto e posteriormente congelados em ultra freezer (-80°) para subsequente infecção. Essas hemácias foram utilizadas para a infecção dos *C. callosus* nos grupos de estudo.

5.4 Delineamento experimental

Para a padronização do desenvolvimento da malária em *C. callosus*, os animais foram infectados com três doses diferentes de hemácias infectadas com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) pela via intraperitoneal, como descrito abaixo:

Grupo 1: 5 *C. callosus* machos infectados com 1×10^7 PbA;

Grupo 2: 5 *C. callosus* machos infectados com 1×10^6 PbA;

Grupo 3: 5 *C. callosus* machos infectados com 1×10^5 PbA;

Grupo 4: 5 *C. callosus* fêmeas infectados com 1×10^7 PbA;

Grupo 5: 5 *C. callosus* fêmeas infectados com 1×10^6 PbA;

Grupo 6: 5 *C. callosus* fêmeas infectados com 1×10^5 PbA;

O uso de diferentes concentrações de hemácias infectadas se justifica pelo fato de que não sabíamos se o *C. callosus* seria resistente ou suscetível a infecção por *P. berghei* ANKA. Os animais foram observados durante o decorrer da infecção para que fosse analisada em qual dose apresentariam a sintomatologia de malária experimental. Após a infecção e ao atingir a concentração parasitária que usualmente provoca sintomas de malária, os grupos de animais infectados foram eutanasiados para análise de parâmetros hematológicos.

5.5 Infecção

Ao atingirem a idade experimental (7-8 semanas) os animais foram inoculados por via intraperitoneal com doses de hemácias parasitadas por *P. berghei* ANKA que foram estabelecidas durante o procedimento. Durante a infecção por diferentes doses os animais estavam sendo monitorados diariamente quanto ao peso e parasitemia. Para essa análise, amostras de sangue foram coletadas por punção caudal diariamente a partir do quarto dia até o nono dia de infecção, depois de três em três dias até o trigésimo dia de infecção.

5.6 Avaliação do escore de morbidade e estabelecimento de ponto final humanitário

A morbidade dos animais foi avaliada diariamente, duas vezes ao dia, quanto ao desenvolvimento de malária a partir do 4º dia de infecção até o 9º dia e após esse período de três em três dias até o 30º dia de infecção, usando uma adaptação do escore Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS). O escore RMCBS é uma escala quantitativa que permite acompanhar os sinais clínicos específicos da malária avaliando 10 parâmetros: andar, equilíbrio, desempenho motor, posição corporal, força dos membros, escape ao toque, reflexos de pinna, reflexos digitais, agressividade e higiene. Cada parâmetro é pontuado desde 0 até 2, sendo que esses valores representam mínima e máxima função, respectivamente. A pontuação de cada item é somada sendo o escore máximo total de 20 (Carroll et al., 2010). Para monitorar o escore RMCBS, cada animal foi posicionado sobre a tampa invertida do micro isolador pelo tempo necessário para avaliar todos os parâmetros.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no escore RMCBS

Parâmetro	Score	Descrição
Andar	(0-2)	Sem movimento (0), atáxico (1), movimentação normal (2)
Equilíbrio	(0-2)	Sem extensão corporal (0), extensão das patas frontais na parede (1), corpo inteiro levantado (2)
Desempenho motor	(0-2)	Nenhum (0), 2-3 cantos explorados em 90 segundos (1), exploração dos 4 cantos em 15 segundos (2)
Posição corporal	(0-2)	De lado (0), curvado (1), extensão completa (2)
Força dos membros	(0-2)	Hipotônico, sem agarre (0); débil agarre, apenas das patas frontais (1); forte agarre (2)
Escape ao toque	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Reflexos auditivos	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Reflexos digitais	(0-2)	Nenhum (0), unilateral (1), bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2)
Agressividade	(0-2)	Nenhuma (0), tentativa de mordida durante o corte da cauda (1), tentativa de mordida antes do corte da cauda (2)
Higiene	(0-2)	Despenteado, com faixas de pelo fora de lugar (0), empoeirado/arrepido (1), normal/ limpo e com brilho (2)

Fonte: Adaptado de Carroll et al., (2010).

Porém, dada a natureza dos animais avaliados, alguns testes não eram viáveis, devido a isso adaptamos o teste de avaliação para 8 parâmetros, sendo eles: andar, equilíbrio, desempenho motor, posição corporal, cor dos membros, reflexos auditivos, higiene e estado do olho. Os parâmetros foram adaptados para melhor corresponder aos sinais clínicos apresentados pelos animais, alguns mencionados na primeira escala não seriam possíveis de avaliar, por exemplo, quanto ao escape ao toque, os roedores *Calomys callosus* demonstraram comportamento contrário, quando expostos a situações de fuga eles apresentavam o comportamento de “Freezing”, ou seja, ficavam congelados, estáticos em uma posição.

Já no caso do parâmetro “força dos membros”, o teste exigia que o pesquisador realizasse a tração da cauda do animal, enquanto ele se apoiava com os membros torácicos na grade, procedimento que não é viável para os roedores da espécie *Calomys*. Esses roedores empregam como estratégia de defesa a autotomia caudal, ou seja, eles podem desprender voluntariamente a pele da cauda, assim como o “rato-do-algodão” (*Sigmodon hispidus*)

(Hosotani et al., 2021). Essa característica impossibilita a tração contínua da cauda para conduzir o teste com eficácia. Os parâmetros finais, após a adaptação para a espécie, totalizaram 16 pontos, com cada parâmetro avaliado em uma escala de 0 a 2, sendo 0 considerado ruim, 1 intermediário e 2 bom.

Tabela 2. Parâmetros adaptados a partir do escore RMCBS

Parâmetros	Score (0-2)	Descrição
Andar	(0-2)	Sem movimento (0); atáxico (1); movimentação normal (2).
Equilíbrio	(0-2)	Sem extensão corporal (0); extensão das patas frontais na parede (1); corpo inteiro levantado (2).
Desempenho motor	(0-2)	Nenhum (0); 2-3 cantos explorados em 90 segundos (1); exploração dos 4 cantos em 15 segundos (2).
Posição corporal	(0-2)	De lado (0); curvado (1); extensão completa (2).
Cor dos membros	(0-2)	Palidez esbranquiçadas dos membros superiores e posteriores (0); membros com cor rosa claro (1); membros de coloração avermelhada em toda sua extensão (2).
Reflexos de pinna	(0-2)	Nenhum (0); unilateral (1); bilateral e instantâneo em 3 tentativas (2).
Higiene	(0-2)	Pelo eriçado, com faixas de pelo fora de lugar principalmente próximo a região do pescoço (0); empoeirado/arrepiado (1); normal/ limpo e com brilho (2).
Estado do olho	(0-2)	Olhos serrados, com dificuldade de abertura, presença de secreções (0); olhos semicerrados, mas sem presença de secreções (1); Olhos abertos, sem presença de secreções ou estado indicativo de irritação, limpos e brilhantes (2).

Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Carroll et al., (2010).

5.7 Análise de parasitemia

A parasitemia dos animais foi determinada por meio de análise de amostras sanguíneas utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, a partir do quarto dia de infecção. Cada roedor teve uma gota de sangue retirada através de punção da veia lateral da cauda com agulha descartável 26G (13 x 0,45), duas lâminas foram utilizadas, uma para receber a gota de sangue e outra para espalhar o sangue sobre a superfície da primeira lâmina de forma uniforme apresentando uma camada fina de células sanguíneas. Após a secagem dessa camada, a coloração foi feita através do método de coloração Panótico Rápido, inicialmente foi realizada a fixação para manter as células no lugar e evitar que se desfaçam durante a coloração, as lâminas foram submersas na solução mantendo-se um movimento contínuo de cima para baixo seguida deixar a lâmina escorrer. Em seguida o mesmo procedimento foi realizado com os dois corantes subsequentes, primeiro corante eosinofílico e por fim corante basofílico. Após essas etapas as lâminas foram enxaguadas suavemente para remover o excesso de corante e, em seguida, secas em temperatura ambiente.

5.8.1 Estabelecimento do ponto final humanitário

O ponto final humanitário estabelecido no caso da infecção por *Plasmodium berghei* em roedores *Calomys callosus* levou em conta alguns aspectos apresentados pelo animal no decorrer da infecção, sendo eles:

- A ausência de limpeza do animal e seus pelos eriçados.
- Olhos profundos, semicerrados ou fechados.
- Prostração prolongada, tempo maior que 1 hora.
- Incoordenação motora, paralisia, relutância em se mover.
- Respiração laboriosa
- Curvatura corporal persistente.
- Desidratação intensa, com turgor cutâneo maior que 2 segundos.

5.8.2 Coleta de material biológico

Os grupos estabelecidos foram infectados por via intraperitoneal e, após esta etapa, foram submetidos ao monitoramento diário para avaliação dos parâmetros clínicos. Quando os animais apresentaram sinais compatíveis com o ponto final humanitário previamente estabelecido, foram anestesiados com isoflurano por via inalatória para a realização da coleta sanguínea através do plexo retro-orbital. Imediatamente após o procedimento de coleta, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os protocolos éticos para experimentação animal.

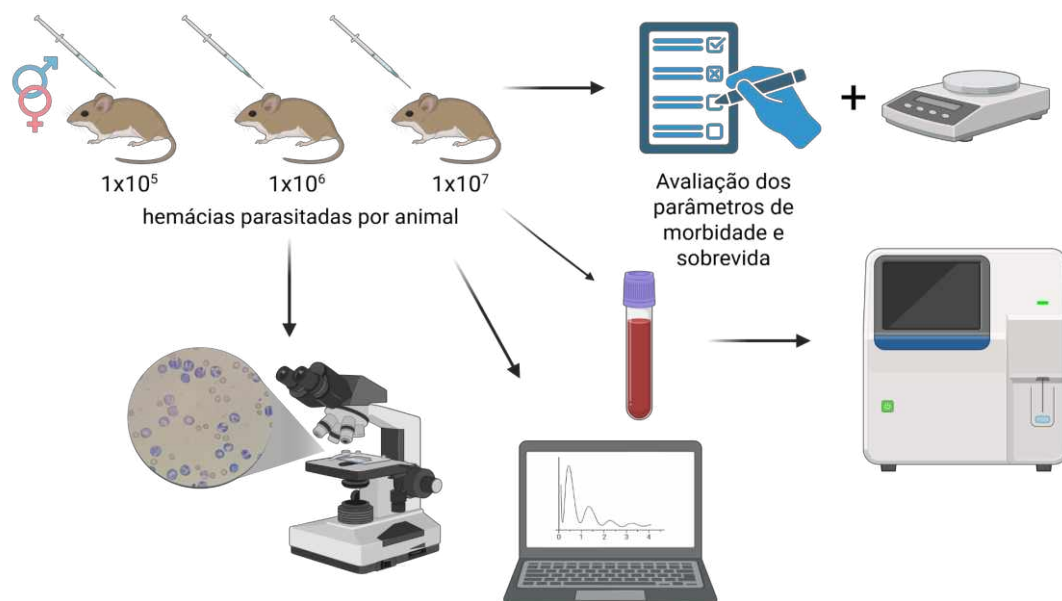
O sangue foi coletado e preservado de acordo com a finalidade experimental. As carcaças foram encaminhadas para descarte em local apropriado no REBIR-UFU. Os animais que não atingiram o ponto final humanitário previamente estabelecido foram eutanasiados no 30º dia de infecção, considerado o ponto final experimental previsto para esse experimento.

5.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os grupos foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS). Os testes estatísticos foram selecionados conforme o tipo de análise a ser realizada. Para a avaliação da morbidade, parasitemia e parâmetros hematológicos, foi utilizado o teste One-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey's multiple comparisons test. A curva de sobrevivência foi analisada por meio dos testes Log-rank e Gehan-Breslow-Wilcoxon. A análise da curva de ganho ou perda de peso corporal foi realizada utilizando o teste Two-way ANOVA.

Figura 4: Delineamento experimental elaborado utilizando o software BioRender.

O esquema apresentado foi elaborado utilizando o software BioRender. Ao atingirem a idade experimental (7–8 semanas), os animais foram inoculados por via intraperitoneal com hemácias parasitadas por *Plasmodium berghei* ANKA. A avaliação dos parâmetros experimentais, incluindo pesagem e parasitemia, foi realizada diariamente do 4º ao 9º dia após a infecção e, posteriormente, a cada três dias até o 30º dia. Quando os animais atingiram o ponto final humanitário previamente estabelecido, foram eutanasiados para a coleta de sangue total por via retroorbital. Em seguida, foram realizadas análises hematológicas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



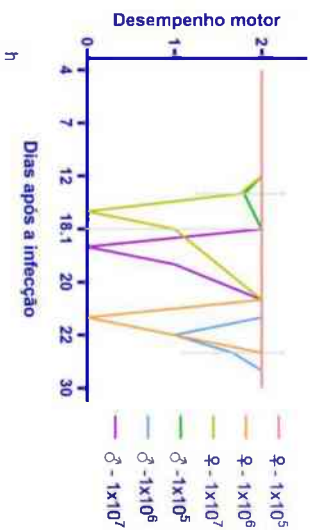
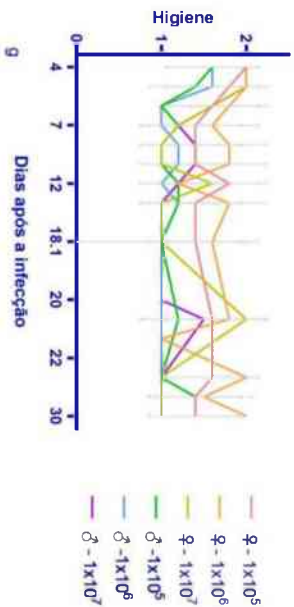
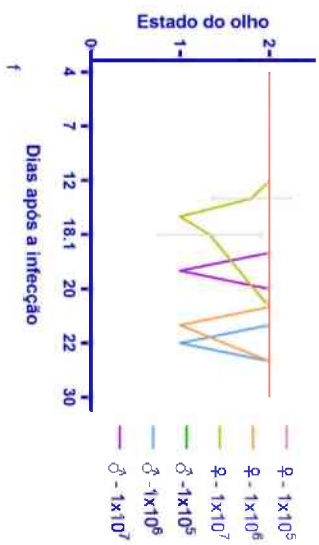
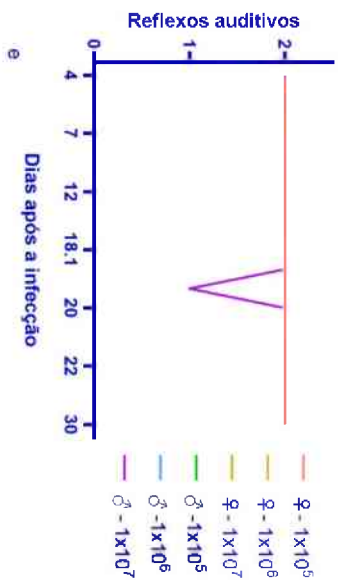
Fonte: Elaborado pela autora

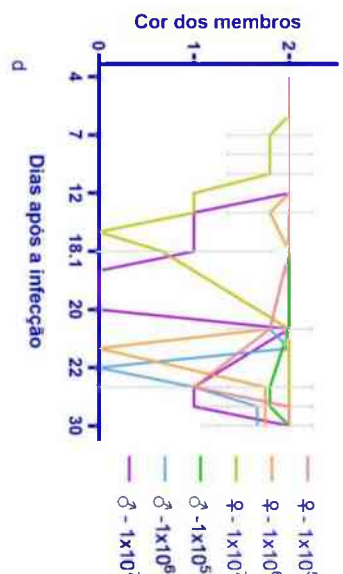
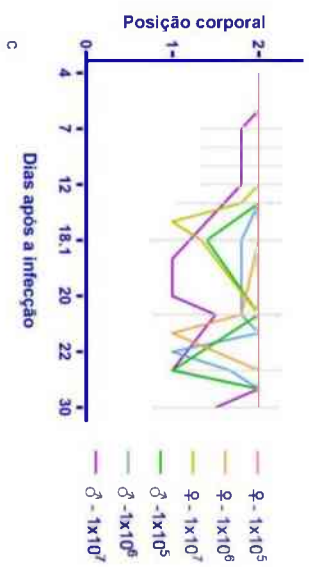
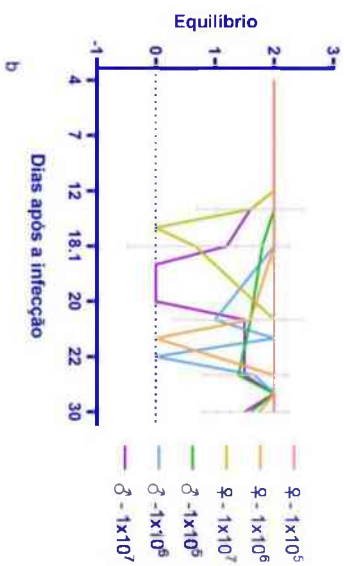
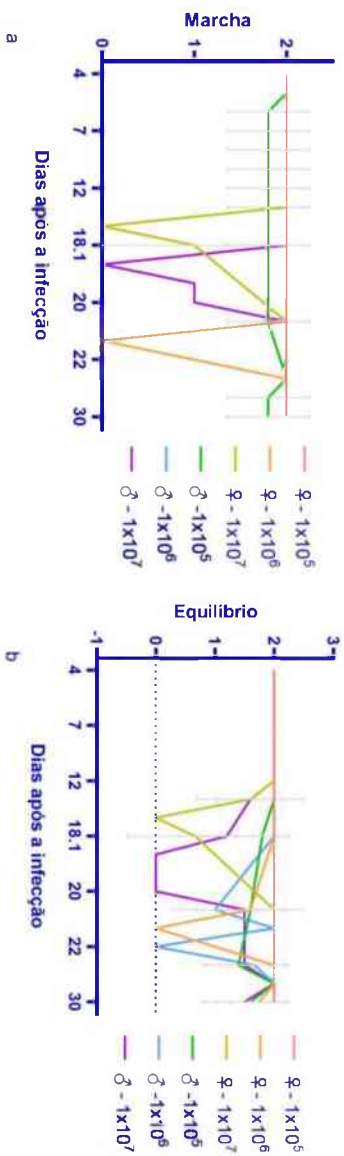
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 O modelo *Calomys callosus* se apresentou eficaz para a infecção de *Plasmodium berghei*.

Após a infecção, os animais foram avaliados a partir do 4º dia pós infecção (dpi) até o 9º dia e depois de 3 em 3 dias até os 30º dias pós infecção. Nessas avaliações eram avaliadas o escore de morbidade Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS).

Figura 5: Escores de morbidade avaliados a partir da infecção de *Calomys callosus* com diferentes doses de *Plasmodium berghei* ANKA.





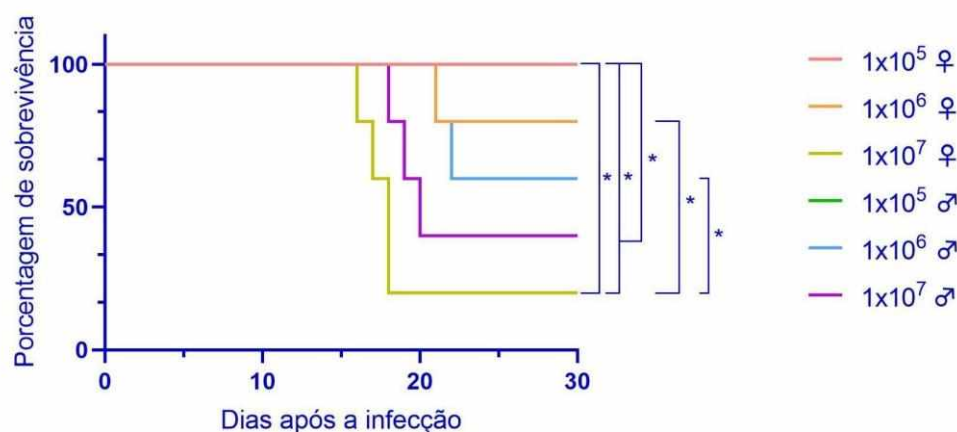
Em (a) marcha, (b) equilíbrio, (c) posição corporal, (d) cor dos membros, (e) reflexos de pinna, (f) estado do olho, (g) higiene e (h) desempenho motor. Em x (dias pós-infecção), em y (escala estabelecida de escore de morbidade, 0 a 2). Os dados são apresentados como média de cada grupo \pm erro padrão da média. A análise foi realizada usando o teste One-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey's multiple comparisons test. Asteriscos apontam as diferenças estatísticas encontrada entre os grupos com diferentes doses de infecção. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Conforme apresentado nos gráficos, os animais infectados com a maior dose infectante (1×10^7) apresentaram as alterações mais significativas na sintomatologia. O parâmetro higiene foi o primeiro a ser afetado, seguido dos parâmetros locomoção, equilíbrio e coloração dos membros, sendo estes os mais afetados. Alterações semelhantes foram observadas em estudos utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *P. berghei* (SIFONTES, 2017)

Essas alterações podem ser atribuídas à progressão da doença, uma vez que a maturação do parasita resulta na perda de eritrócitos e induz uma eritropoiese ineficaz (Lamikanra et al., 2007; Evans et al., 2006). De modo geral, parâmetros como marcha, higiene e posição corporal são amplamente utilizados para a avaliação do estado geral de roedores. Em condições de saúde, esses animais podem dedicar até 20% do tempo ativo à realização da limpeza corporal (grooming) e cerca de 40% à exploração do ambiente e à alimentação (CHUMBINHO et al., 2012). Assim, a redução das atividades de higiene e exploração é frequentemente observada em animais doentes, representando um mecanismo fisiológico para a conservação de energia (KLEIN et al., 2021).

6.2 - Os animais infectados com 1×10^7 hemácias parasitadas apresentaram menor taxa de sobrevivência.

Figura 6: Gráfico apresentando a curva de sobrevivência dos animais conforme os dias após a infecção.

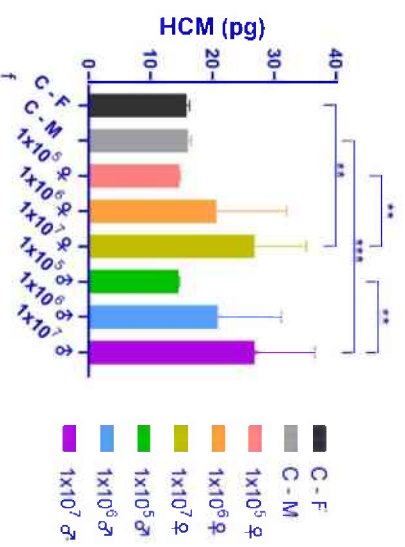
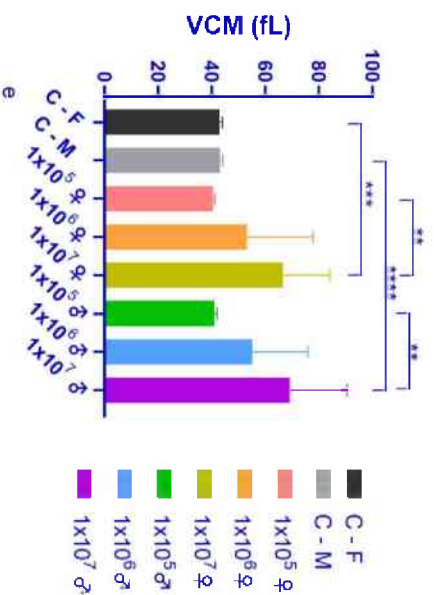
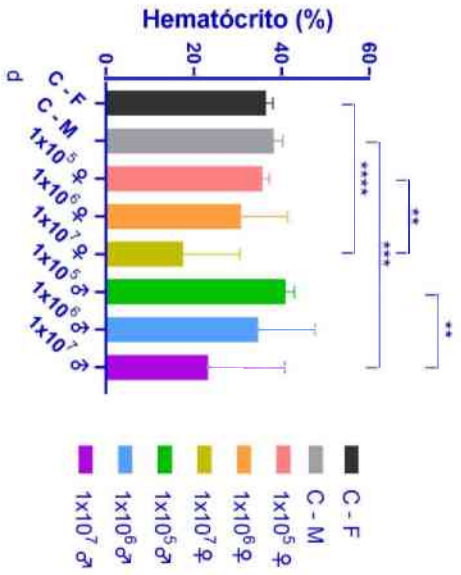
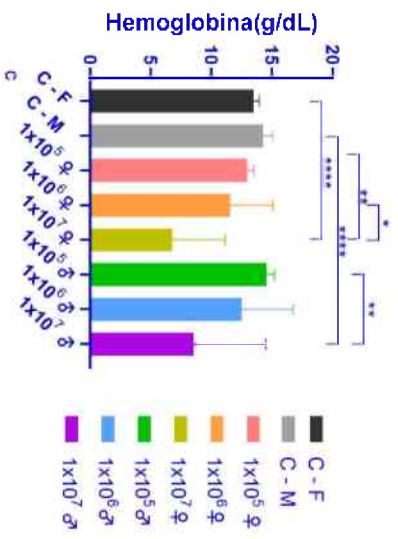
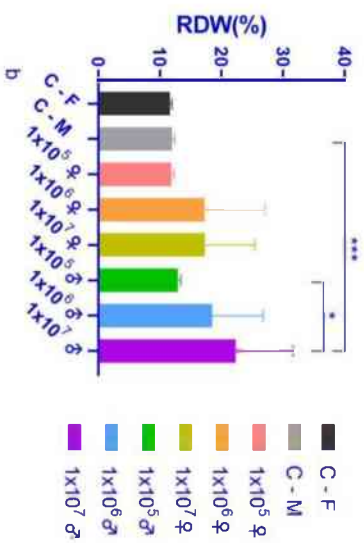
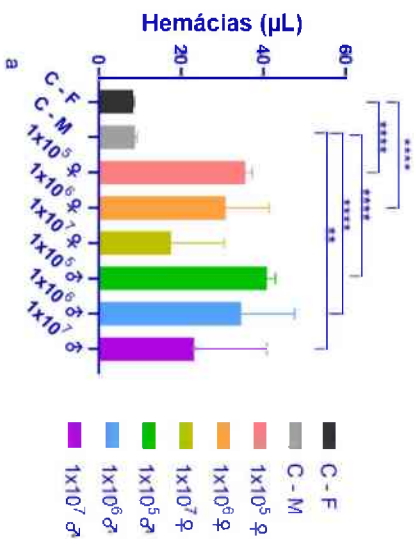


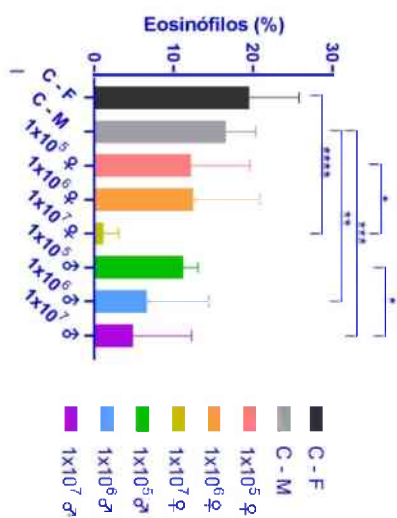
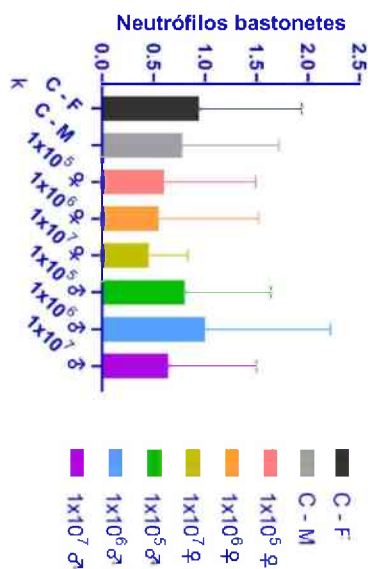
Os dados são apresentados como média de cada grupo \pm erro padrão da média. Em x (dias pós-infecção), em y (porcentagem de sobrevivência dos indivíduos escala de 100 %). A sobrevivência foi analisada usando o teste de comparação entre curvas, onde foram definidas a partir dos testes log-rank e Gehan-Breslow-Wilcoxon. Asteriscos apontam as diferenças estatísticas encontrada entre os grupos com diferentes doses de infecção. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

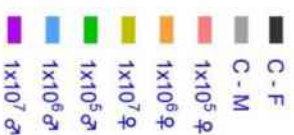
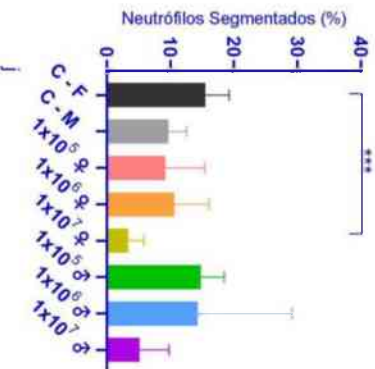
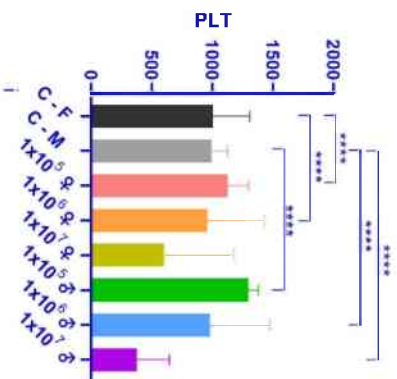
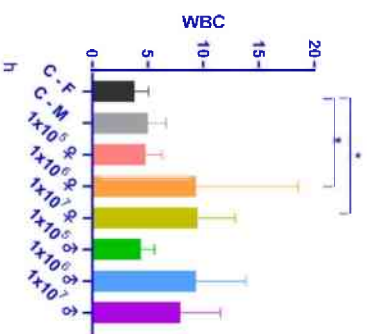
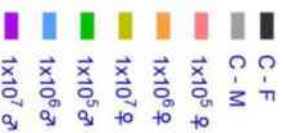
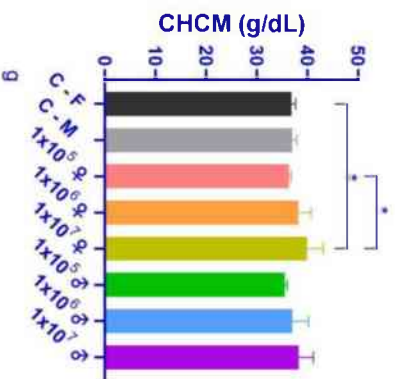
Após a infecção, verificou-se que a maioria dos animais expostos à dose de 1×10^7 hemácias parasitadas sucumbiu entre os dias 15 e 18 pós-infecção, apresentando sinais clínicos de malária. Essa dose resultou na menor taxa de sobrevivência entre os grupos analisados. Em contraste, os animais infectados com a menor dose (1×10^5) apresentaram a maior taxa de sobrevivência. Esse padrão pode ser atribuído à elevada carga parasitária, que acentua a destruição de eritrócitos devido à replicação do parasita (Lamikanra et al., 2007).

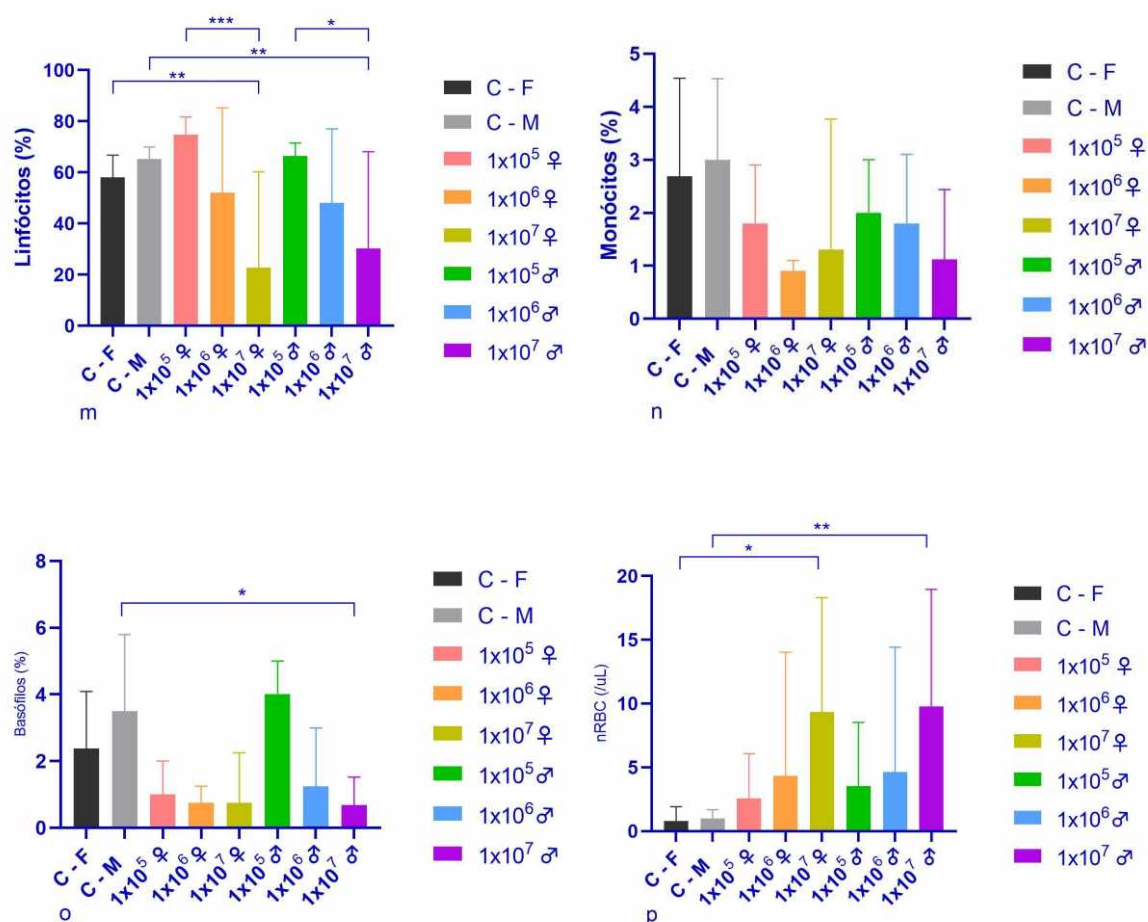
6.3 - Alterações hematológicas compatíveis com anemia foram observadas nos animais após a infecção.

Figura 7 - Parâmetros hematológicos de *Calomys callosus* após infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.









Fonte: Elaborado pela autora

Em x (dias pós-infecção), em y (contagem em % ou microlitros (μl)). Os parâmetros foram analisados usando o teste One-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey's multiple comparisons test. Os dados são apresentados como média de cada grupo ± desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças estatísticas encontrada entre os grupos com diferentes doses de infecção. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001. Em (a) hemácias (μl) (RBC); (b) amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (%) (RDW); (c) hemoglobina (g/dL) (Hb); (d) hematócrito (%) (Ht); (e) volume corpuscular médio (fL) (VCM); (f) hemoglobina corpuscular média (pg) (HCM); (g) concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) (CHCM); (h) contagem de glóbulos brancos (μL/μL) (WBC); (i) contagem de plaquetas (μL) (PLT); (j) neutrófilos segmentados (%); (k) neutrófilos bastonetes; (l) eosinófilos (%); (m) linfócitos (%); (n) monócitos (%); (o) basófilos (%); (p) glóbulos vermelhos nucleados (nRBC) (/uL).

Para fins de comparação na análise hematológica, os resultados dos animais não infectados, pertencentes aos grupos Controle Fêmea e Controle Macho, foram obtidos a partir

do estudo “Caracterização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de *C. callosus*” (Coltro, 2022).

Como pode ser observado no gráfico (d), houve uma diminuição do hematócrito nos animais infectados em comparação aos controles, sendo essa redução proporcional ao aumento das doses infectantes. No gráfico (j), neutrófilos segmentados, os grupos infectados com a maior dose infectante sofreram uma queda quando comparados aos controles. Também ocorreu uma queda na contagem plaquetária nos grupos com a maior dose infectante, gráfico (i). O gráfico (b) revelou alterações na coloração das hemácias, sendo essas mais prevalentes nos grupos infectados com a dose 10^7 . A contagem de hemoglobina (c) teve uma queda nos grupos infectados com a maior dose quando comparados com os grupos controle.

As análises hematológicas revelaram neutrofilia, trombocitopenia, anisocitose, policromasia, aumento de eritroblastos, redução do número total de hemácias, diminuição da hemoglobina corpuscular e, conseqüentemente, redução do hematócrito.

As alterações hematológicas na malária são esperadas, pois o parasita permanece na corrente sanguínea durante grande parte do seu ciclo de vida. Diversos fatores podem influenciar essas alterações, como, imunidade prévia, presença de hemoglobinopatias, endemicidade da doença e características demográficas. Entre as mais comuns, destacam-se anemia, trombocitopenia, leucocitose e leucopenia, que variam de acordo com a gravidade da infecção e a resposta imunológica do paciente (Roy et al., 2024).

Outros trabalhos envolvendo a infecção por *Plasmodium berghei* em ratos também apresentaram redução no hematócrito, mas não houve diferenças significativas na concentração de leucócitos (Murambiwa et al., 2020). Um estudo com quatro linhagens de camundongos mostrou que a infecção por malária induz linfócitopenia e um aumento no número de neutrófilos. Em todas as linhagens analisadas, observou-se uma redução nas porcentagens de linfócitos em comparação aos valores basais (Wang et al., 2021). Além disso, tanto leucopenia quanto leucocitose são características relatadas na infecção por *Plasmodium* (Rani et al., 2021).

6.4 - Após a infecção os animais apresentaram perda de peso corporal.

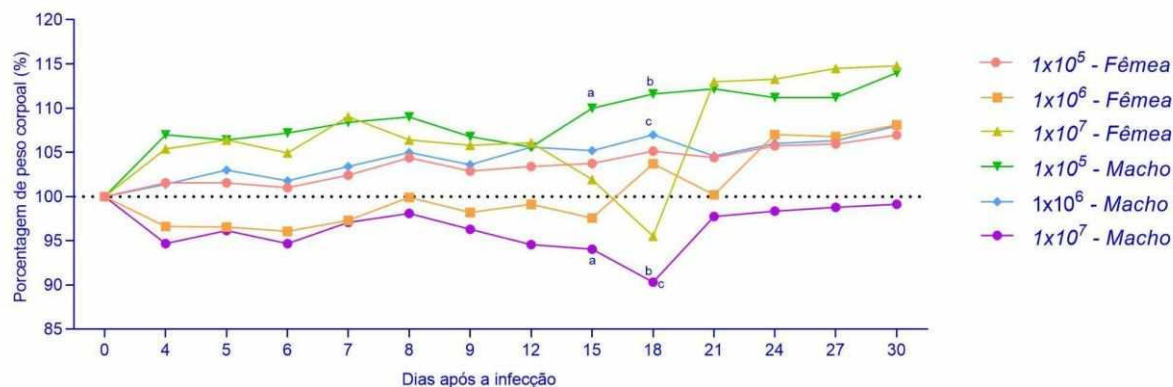


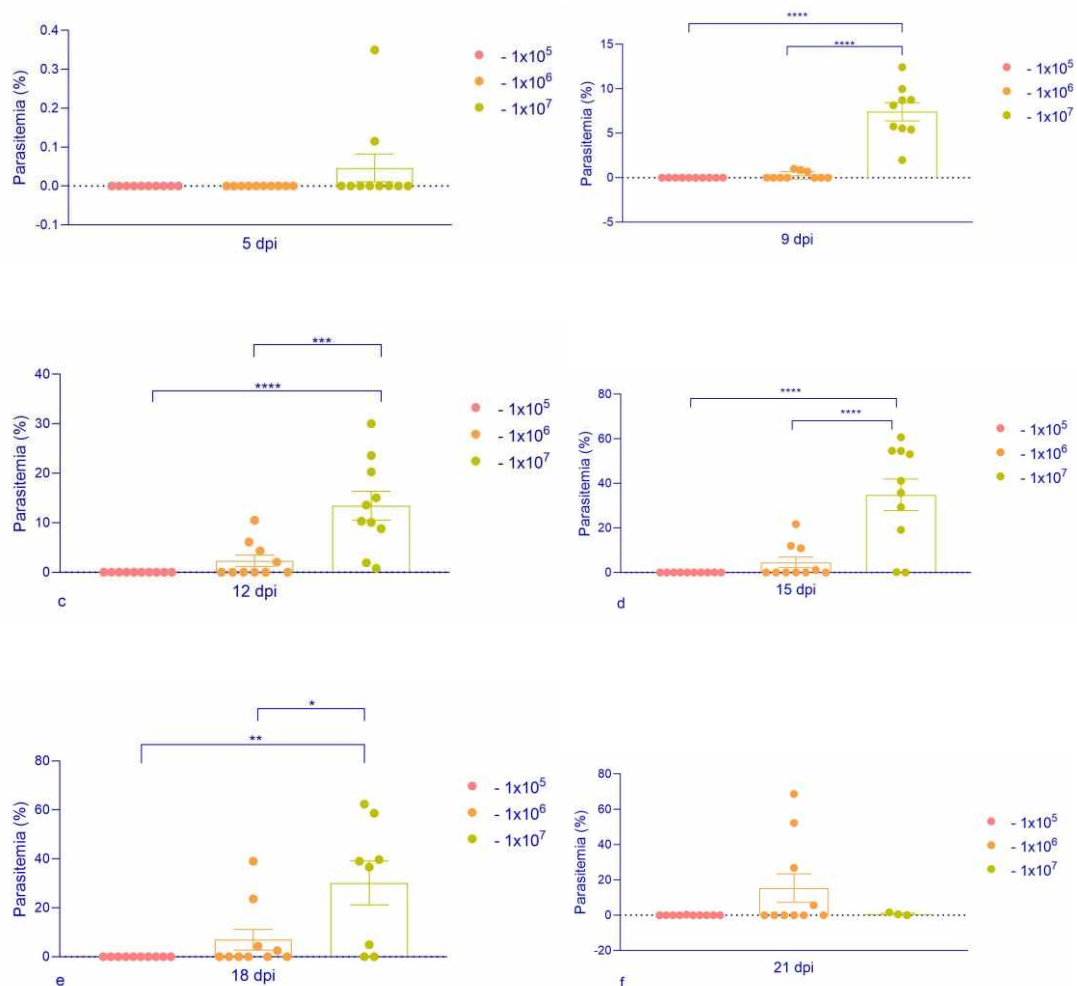
Figura 8: Gráfico de porcentagem de ganho/perda de peso corporal de roedores *Calomys callossus* infectados/ com *Plasmodium berghei* - ANKA (PbA).

As diferenças estatísticas foram visualizadas nos dias 15 dpi e 18 dpi. No dia 15 dpi se apresentou entre os grupos 1×10^5 macho vs. 1×10^7 macho (a - $p < 0,05$), e no dia 18 dpi entre os grupos 1×10^5 macho vs. 1×10^7 macho (b - $P > 0,001$) e entre os grupos 1×10^6 macho vs. 1×10^7 macho (c - $p < 0,05$). Em x (dias pós-infecção), em y (porcentagem de peso corporal (%)). Os parâmetros foram analisados usando o teste Two-way ANOVA. Os dados são apresentados como média de cada grupo \pm desvio padrão da média.

Os grupos infectados com a maior dose infectante (1×10^7) apresentaram uma perda de peso mais acentuada ao longo do experimento. A perda de peso progressiva observada entre o 12º e o 18º dia nos grupos infectados com a dose 1×10^7 , sugere um agravamento do quadro clínico, possivelmente associado à diminuição da ingestão de água e alimento em decorrência da evolução da doença. Além disso, os animais que desenvolveram alta parasitemia apresentaram um comprometimento severo do estado geral, chegando a um estágio em que a mobilidade estava significativamente reduzida, o que reforça o impacto da infecção sobre o metabolismo e a capacidade funcional dos indivíduos acometidos.

6.5 Análise de parasitemia

Figura 9: Gráficos de porcentagem de parasitemia de roedores *Calomys calossus* infectados/ com *Plasmodium berghei* - ANKA (PbA).



Fonte: Elaborado pela autora

Em x (dia pós-infecção), em y (porcentagem de parasitemia (%)). Os parâmetros foram analisados usando o teste One-way ANOVA, seguidos do pós-teste de Tukey's multiple comparisons test. Os dados são apresentados como média de cada grupo \pm erro padrão da média. Os asteriscos apontam as diferenças estatísticas encontrada entre os grupos com diferentes doses de infecção. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Em (a) 5 dpi (quinto dia pós infecção); (b) 9 dpi (nono dia pós infecção); (c) 12 dpi (décimo segundo dia pós infecção); (d) 15 dpi (décimo quinto dia pós infecção); (e) 18 dpi (décimo oitavo dia pós infecção); (f) 21 dpi (vigésimo primeiro dia pós infecção).

As análises de parasitemia demonstraram que o grupo infectado com a dose de 1×10^7 apresentou a maior porcentagem de parasitas circulantes quando comparado aos demais grupos, com um pico mais evidente entre o 12º e o 18º dia pós-infecção (dpi). O nível elevado de parasitemia, associado aos demais sinais clínicos observados, contribuiu para o quadro compatível com o ponto final humanitário estabelecido neste estudo.

Apesar disso, um animal macho remanescente do grupo infectado com a dose de 1×10^7 foi capaz de superar a infecção, revertendo os quadros de infecção que chegavam a 30% de células parasitadas permanecendo vivo até o término do experimento (30º dpi), quando foi eutanasiado juntamente com os animais dos outros grupos. Ademais, dois indivíduos, um macho e uma fêmea, mesmo havendo sendo inoculados com a dose infectante de 1×10^7 não apresentaram nenhuma alteração de parasitemia em nenhum dos dias após infecção.

No grupo infectado com a dose 10^6 alguns indivíduos, um macho e uma fêmea, apresentaram parâmetros clínicos e alta contagem de parasitemia, ambos apresentaram cerca de 60% de parasitemia no dia do ponto final humanitário. Além disso, um indivíduo macho do grupo infectado com a dose de 1×10^6 não apresentou alterações em parasitemia no decorrer de todo o experimento, porém apresentou uma área de aumento próximo a região da escápula o que resultou na eutanásia do mesmo.

A dose de 1×10^6 apresentou indivíduos afetados em menor quantidade comparado com a dosagem de 1×10^7 , somente 40% dos indivíduos apresentaram aumento de parasitemia dos grupos infectados com a dose 1×10^6 dos quais somente 20% apresentaram sinais clínicos compatíveis com o ponto final estabelecido. Em comparação, aos animais infectados com a dose infectante 1×10^7 , 80% dos indivíduos apresentaram aumento de parasitemia e 70% apresentaram sinais clínicos compatíveis com o ponto final estabelecido.

Em um estudo envolvendo a inoculação de *Plasmodium berghei* em modelos murinos da linhagem C57BL/6 geneticamente deficientes no receptor de Dectina-1, foi observada uma parasitemia significativamente elevada, resultando em morte por anemia severa (SILVA et al.,

2017). Em infecções humanas a anemia grave se correlaciona com alta parasitemia, mas pode ocorrer também casos de baixa parasitemia e infecção crônica após tratamento (NAGEL, 2002).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, recomenda-se a utilização da dose de 1×10^7 no modelo experimental com *Calomys*, uma vez que, esta dosagem promove uma infecção mais evidente entre os indivíduos, com a maioria dos animais apresentando susceptibilidade ao parasita (80% dos animais com aumento de parasitemia). Além disso, a dose de 1×10^7 demonstrou evolução para quadros de anemia severa, proporcionando um modelo mais padronizado e confiável para estudos experimentais que visam investigar os mecanismos fisiopatológicos da infecção e avaliar potenciais intervenções terapêuticas.

7. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu avaliar o potencial do roedor *Calomys callosus* como modelo experimental para o estudo da malária. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia do modelo na infecção experimental, possibilitando a observação de sinais clínicos compatíveis com a malária murina, além de alterações hematológicas que refletem os efeitos do parasita no organismo.

As análises de parasitemia mostraram que os animais infectados com a dose de 1×10^7 hemácias parasitadas apresentaram as maiores taxas de parasitemia e, conseqüentemente, a menor taxa de sobrevivência, sugerindo uma relação direta entre carga parasitária e gravidade da infecção. Além disso, foram identificadas diversas alterações hematológicas compatíveis com anemia, incluindo redução no número total de eritrócitos, queda nos níveis de hemoglobina e alterações na contagem de leucócitos e plaquetas. A perda progressiva de peso corporal nos animais infectados também se destacou como um achado relevante, evidenciando o impacto sistêmico da infecção.

Diante desses achados, *C. callosus* demonstrou ser um modelo experimental promissor para o estudo da malária, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada da fisiopatologia da doença. A utilização deste modelo pode abrir novas perspectivas para pesquisas futuras, especialmente no que se refere ao desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento da malária e suas complicações, como a anemia malárica grave. Assim, este estudo reforça a importância da experimentação animal na investigação biomédica e abre caminho para novos avanços no combate à malária. No entanto, estudos adicionais são recomendados para validar e aperfeiçoar ainda mais este modelo experimental.

8. ORÇAMENTO

Para execução deste projeto, foram utilizados recursos financeiros e consumíveis disponibilizados através do projeto de pesquisa: “Rede Mineira de Biotecnologia em Modelos Experimentais”. Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG- Edital número 007/2021. Ainda, contou com a infraestrutura do Laboratório de Biotecnologia em Modelos Experimentais (LABME) e da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR).

REFERÊNCIAS

- BALAJI, S. N.; DESSHMUKH, R.; TRIVEDI, V. Severe malaria: Biology, clinical manifestation, pathogenesis and consequences. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 57, n. 1, p. 1–13, 2020.
- BARATA, Rita de Cássia B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 11, p. 128-136, 1995.
- BRUCE-CHWATT, L. J. Malaria and its control: present situation and future prospects. *Annual Review of Public Health*, v. 8, n. 1, p. 75-110, 1987.
- BRUCE-CHWATT, L. J.; WERNSDORFER, W. H.; MCGREGOR, I. *Malaria: principles and practice of malariology*. 1988.
- 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. e13124, 2010.
- CARTER, Richard; MENDIS, Kamini N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002.
- CENEPI, CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA (BRAZIL). Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, 2005.
- 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.
- COLTRO, Gabriel Henrique. Caracterização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de *C. callosus*. 2022.
- CRAIG, Alister G. et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 2, p. e1002401, 2012.
- DE PAIVA ASSIS, Fabiano Kreston et al. Bem-estar de animais de laboratório e seu impacto nas pesquisas científicas. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 3, n. 2, p. 391-396, 2020.
- DEGHAN, Hossein et al. Experimental study on *Plasmodium berghei*, *Anopheles stephensi*, and BALB/c mouse system: implications for malaria transmission blocking assays. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 13, n. 4, p. 549, 2018.

DUMARCHEY, Aurélie; LAVAZEC, Catherine; VERDIER, Frédérique. Erythropoiesis and malaria, a multifaceted interplay. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 21, p. 12762, 2022.

EKVALL, Håkan. Malária e anemia. *Opinião Atual em Hematologia*, v. 10, n. 2, p. 108-114, 2003.

ELING, W.; VAN ZON, A. A. J. C.; JERUSALEM, C. The course of a *Plasmodium berghei* infection in six different mouse strains. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 54, p. 29-45, 1977.

EVANS, Krystal J. et al. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood*, v. 107, n. 3, p. 1192-1199, 2006.

FONSECA, Fernanda et al. Relationship between the colours of the rivers in the Amazon and the incidence of malaria. *Malaria Journal*, v. 22, n. 1, p. 358, 2023.

FRANÇA, Tanos C. C.; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D. Malária: aspectos históricos e quimioterápicos. *Química Nova*, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

FRANCO, Priscila Silva et al. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. *Parasitology Research*, v. 113, p. 2655-2664, 2014.

GHAZANFARI, N. et al. Cerebral malaria in mouse and man. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 412582, 2018.

GHAZANFARI, N. et al. Investigating the role of malaria-specific T cells in malaria pathogenesis. In: *European Journal of Immunology*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016. p. 665.

GHAZANFARI, N. et al. Investigating the role of malaria-specific T cells in malaria pathogenesis. In: *EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY*. 2016. p. 665.

GHAZANFARI, N. et al. Investigating the role of malaria-specific T cells in malaria pathogenesis. *European Journal of Immunology*, 2016.

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

GHOSH, Kanjaksha; GHOSH, Kinjalka. Patogênese da anemia na malária: uma revisão concisa. *Parasitology Research*, v. 101, p. 1463-1469, 2007.

GREENWOOD, Brian; DRAKELEY, Chris. Primaquina e *Plasmodium vivax*: recorrência da malária no Brasil. *The New England Journal of Medicine*, v. 13, p. 1282-1283, 2022.

GUIDA brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica / Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 1. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2023. 1107 p.

HOSOTANI, Marina et al. Unique histological features of the tail skin of cotton rat (*Sigmodon hispidus*) related to caudal autotomy. *Biology Open*, v. 10, n. 2, p. bio058230, 2021.

HOWARD, Martin R. Walcheren 1809: uma catástrofe médica. *BMJ*, v. 7225, p. 1642-1645, 1999.

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

JONES, Trevor R. et al. Anemia em macacos *Aotus* imunizados com parasitas e proteínas recombinantes infectados com *Plasmodium falciparum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 6, p. 672-679, 2002.

KLEIN, Sandra Gabriela et al. A simple and low-cost environmental enrichment program improves the welfare of *Calomys callosus*, a species that adapts to animal facilities. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 11, p. 1436907, 2024.

KLEIN, Sandra Gabriela et al. Utilização de um fragmento variável de cadeia simples (scFv) anti-Glicosilfosfatidilinositol (GPI) como potencial tratamento para malária cerebral em modelo murino. 2021.

KLEIN, Sandra Gabriela. *Roedores da espécie Calomys callosus*. 2023. 1 fotografia.

LAMB, Tracey J. et al. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 8, n. 6, p. 1-22, 2006.

LAMB, Tracey J.; LANGHORNE, Jean. The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites. *Malaria Journal*, v. 7, p. 1-9, 2008.

LAMIKANRA, Abigail A. et al. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*, v. 110, n. 1, p. 18-28, 2007.

LENZI, Jane A. et al. Intestinal fibrovascular nodules caused by *Schistosoma mansoni* infection in *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae): a model of concomitant fibrosis and angiogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 117-127, 2002.

MELLO, Dalva A.; TEIXEIRA, Maria Lucia. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). *Revista de Saúde Pública*, v. 18, p. 337-341, 1984.

MILNER, Danny A. Patogênese da malária. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 1, p. a025569, 2018.

MOLINEAUX, L. et al. The epidemiology of malaria and its measurement. In: *Malaria: principles and practice of malariology*. v. 2, p. 999-1089, 1988.

MURAMBIWA, Pretty et al. Chemokine, cytokine and haematological profiles in Sprague-Dawley rats co-infected with *Plasmodium berghei* ANKA and *Trichinella zimbabwensis* – A laboratory animal model for malaria and tissue-dwelling nematodes co-infection. *Heliyon*, v. 6, n. 2, 2020.

NAGEL, Ronald L. Malarial anemia. *Hemoglobin*, v. 26, n. 4, p. 329-343, 2002.

NEWTON, Charles R. J. C.; KRISHNA, Sanjeev. Malária falciparum grave em crianças: compreensão atual da fisiopatologia e tratamento de suporte. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 79, n. 1, p. 1-53, 1998.

OLATUNDE, Adesola C. et al. Mouse models for unravelling immunology of blood stage malaria. *Vaccines*, v. 10, n. 9, p. 1525, 2022.

ONU ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. Nova Iorque, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/91863-agenda-2030-para-o-desenvolvimento-sustent%C3%A1vel>. Acesso em: 04 jul. 2025.

PERKINS, Douglas J. et al. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, v. 7, n. 9, p. 1427, 2011.

ROSA, Rafael Borges et al. *Calomys callosus*: um modelo animal experimental aplicado à investigação de doenças parasitárias de interesse para a saúde pública. *Patógenos*, v. 11, n. 3, p. 369, 2022.

ROWE, Alexander K. et al. O peso da mortalidade por malária entre crianças africanas no ano 2000. *Revista Internacional de Epidemiologia*, v. 35, n. 3, p. 691-704, 2006.

SÁ, Ivone Manzali de. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, ciências, saúde-Manguinhos*, v. 18, p. 407-430, 2011.

SAHU, Praveen K. et al. Brain magnetic resonance imaging reveals different courses of disease in pediatric and adult cerebral malaria. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, n. 7, p. e2387-e2396, 2021.

SALMON, M. G. et al. Premature removal of uninfected erythrocytes during malarial infection of normal and immunodeficient mice. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 108, n. 3, p. 471-476, 1997.

SANTOS, Carla Domingues et al. *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus*, a natural reservoir of infection. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 2, p. 197-201, 2008.

SIFONTES, Yusmaris Josefina Cariaco et al. Papel do extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* na infecção de camundongos C57BL/6 por *Plasmodium berghei* ANKA. 2017.

SILVA, Murilo Vieira da et al. Avaliação do papel do receptor imune inato dectina-1 e antígenos solúveis de *Neospora caninum* no tratamento da malária cerebral murina. 2017.

SIMWELA, Nelson V.; WATERS, Andrew P. Current status of experimental models for the study of malaria. *Parasitology*, v. 149, n. 6, p. 729-750, 2022.

SN, WickraMaSinghe. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, v. 13, p. 277-299, 2000.

TÉLLEZ, Jessica. Relación entre el clima y la transmisión de la malaria en la Costa Atlántica: Un trabajo de investigación formativa. *Duazary: Revista Internacional de Ciencias de la Salud*, v. 1, n. 2, p. 86-91, 2004.

TRAPE, Jean-François. O impacto da resistência à cloroquina na saúde pública na África. In: *O fardo intolerável da malária: um novo olhar sobre os números*. Suplemento ao volume 64(1) do *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001.

UWIMANA, Aline et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nature medicine*, v. 26, n. 10, p. 1602-1608, 2020.

WANG, Huajing et al. Analysis of spleen histopathology, splenocyte composition and haematological parameters in four strains of mice infected with *Plasmodium berghei* K173. *Malaria Journal*, v. 20, p. 1-12, 2021.

WHO. *World malaria report 2021*. Geneva: World Health Organization, 2021.

WHO. *World malaria report 2023*. Geneva: World Health Organization, 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. *World malaria report 2024: Addressing Inequity in the Global Malaria Response*. Geneva: World Health Organization, 2024.