



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

**Camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA
apresentam diferentes alterações intestinais durante a malária cerebral e
não cerebral**

Laura Alejandra Lozano Trujillo

**Uberlândia
Outubro-2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

**Camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA
apresentam diferentes alterações intestinais durante a malária cerebral e
não cerebral**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Coorientadora: Dra. Flavia Batista Ferreira França

Laura Alejandra Lozano Trujillo

Uberlândia
Outubro-2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L925c
2022 Lozano Trujillo, Laura Alejandra, 1993-
 Camundongos C57BL/6 infectados com Plasmodium berghei
 ANKA apresentam diferentes alterações intestinais durante a malária
 cerebral e não cerebral [recurso eletrônico] / Laura Alejandra Lozano
 Trujillo. - 2022.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

Coorientadora: Flavia Batista Ferreira França.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7014>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-, (Orient.). II. França,
Flavia Batista Ferreira, 1987-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 07/2022, do PPGBC				
Data:	31 de Outubro de 2022	Hora de início:	14hs	Hora de encerramento:	17:45hs
Matrícula do Discente:	12012BCE004				
Nome do Discente:	Laura Alejandra Lozano Trujillo				
Título do Trabalho:	Avaliação Intestinal de camundongos C57BL/6 infectados com Plasmodium berghei ANKA - modelo de Malária Cerebral				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular de Doenças Infecciosas e Degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Papel do ferro e da Heme-oxigenase-1 na infecção por Toxoplasma e toxoplasmose e malária congênitas				

Reuniu-se, por Videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Doutores: **Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes** - University of Ottawa; Prof. **Marcelo Emílio Beletti** - UFU; e Profa. **Neide Maria da Silva**, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Neide Maria da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente **Laura Alejandra Lozano Trujillo** a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/10/2022, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/10/2022, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes, Usuário Externo**, em 31/10/2022, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4031736** e o código CRC **0AD7EE83**.

*A mi madre, porque todo lo bueno que soy es por ti,
porque me diste alas me has impulsado a usarlas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir desenvolver este trabalho, pelos aprendizados, todas as experiencias e pessoas que estiveram no meu caminho durante este tempo.

À minha família, minha mãe, meu pai e meus irmãos que sempre tem me apoiado e amado incondicionalmente. A meus tios e primos que me animaram a seguir meus sonhos. A todos eles que tem sido parte de minha formação como pessoa.

Ao Luís Carlos Casas, por sua amizade incondicional, pela infinita paciência, por seu apoio e compreensão... por ser meu amigo imaginário...

À Profa. Neide Maria da Silva Obrigado por me receber e abrir as portas de seu laboratório, pelo aprendizado, orientação e por me permitir realizar este projeto.

Obrigada Flavia porque foi mais que minha coorientadora, me deu sua amizade, me ensinou, me escutou, me animou, por sua confiança, foi a melhor companhia, obrigada por me animar a continuar.

Ao Marcos e Yusmaris por sua ajuda guia e apoio no laboratório.

À Nelly que foi a irmã que nunca tive, a pessoa que só pela sorte do destino e dos presentes que Deus dá para nós, eu conheci, obrigada por ser minha companhia, minha amiga, por todo o apoio e incondicionalidade, do princípio ao fim desta experiencia.

Aos colombianos que vieram a ser minha família, ao David por seu apoio, ensinso, paciência e mimos, por me fazer crer em mim e a Tati, por sua amizade, companhia, orientação. Porque sempre me escutaram quando sabiam que tudo que eu precisava era falar!....

À família de estrangeiros, Aryani obrigada por estar sempre aí para mim. ao Kelvin por sua companhia e risos, aos dois por seus chás de fofoca! danças, risadas. Ao Sandro pela sua incondicionalidade. Ao Jossimar, pelas boas conversas.

A minha amiga Christabel, pela sua companhia e apoio nos longos dias de trabalho.

À Ana Paula, por sua energia maravilhosa que me deu alegria quando eu mais precisava, por sua ajuda nos experimentos, por seus ensinso.

À professora Bellisa por receber-me no programa, a seu grupo de trabalho, Samuel, Guilherme, Clara, Joed, pela ajuda e boas conversas.

Aos professores do programa de Biologia Celular e estrutural obrigado pelas excelentes aulas e aprendizados

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À OEA e à GCUB pela oportunidade de vir estudar no Brasil.

A todos e cada um que fez esta experiencia inesquecível e enriquecedora.

“La vida no es la que uno vivió sino la que uno recuerda y cómo la recuerda para contarla”.
"A vida não é aquela que você viveu, se não aquela que você lembra e como você lembra
para contá-la".

Vivir para contarla.
Gabriel García Márquez

RESUMO

A infecção por *Plasmodium* é uma das infecções parasitárias com maior incidência no mundo, sendo a complicação mais grave a malária cerebral causada por *P. falciparum*. Além dos sintomas cerebrais, também causa manifestação no sistema gastrointestinal, sendo os mecanismos que levam a sintomas intestinais pouco conhecidos. Assim, neste trabalho objetivou-se avaliar as possíveis alterações intestinais em um modelo animal de malária cerebral, buscando entender se existe relação entre o desenvolvimento de malária cerebral e alterações intestinais. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com *Plasmodium berghei* ANKA^{GFP+} e observados quanto às manifestações clínicas, atividade intestinal e mensuração das características macro e microscópicas do intestino, além de analisar a expressão de alguns genes como ChrgA, Tph-1, Muc-2, VIP, Piezzo-2, Hes-1 e Noch-1. Animais com malária cerebral apresentaram diminuição do peso, motilidade e aumento do muco intestinal. Além disso, foi observado que os animais com malária cerebral apresentaram uma hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes, ao contrário dos animais infectados que não desenvolveram malária cerebral. Por outro lado, os animais infectados que desenvolveram malária cerebral apresentam uma diminuição de células enterocromafins. Também, foi observado diminuição na expressão de mRNA de VIP no intestino dos animais que desenvolveram malária cerebral. Estes resultados sugerem que a infecção por *P. berghei* ANKA afeta os intestinos de forma distinta quando os animais desenvolvem ou não malária cerebral e que a diminuição da expressão de mRNA de VIP pode estar envolvida nas alterações nos animais que desenvolvem malária cerebral.

Palavras chaves: *Plasmodium berghei* ANKA, malária cerebral, intestino, células enterocromafins, células caliciformes.

ABSTRACT

Plasmodium infection is one of the parasitic infections with the highest incidence in the world, the most serious complication being cerebral malaria caused by *P. falciparum*. In addition to brain symptoms, it also causes manifestation in the gastrointestinal system, and the mechanisms that lead to intestinal symptoms are poorly understood. Thus, this study aimed to evaluate possible intestinal alterations in an animal model of cerebral malaria, seeking to understand whether there is a relationship between the development of cerebral malaria and intestinal alterations. C57BL/6 mice were inoculated with *Plasmodium berghei* ANKA^{GFP+} and observed for clinical manifestations, intestinal activity and measurement of macro and microscopic characteristics of the intestine, in addition to analyzing the expression of some genes such as ChrgA, Tph-1, Muc-2, VIP, Piezzo-2, Hes-1 and Noch-1. Animals with cerebral malaria showed decreased weight, motility and increased intestinal mucus. Furthermore, it was observed that animals with cerebral malaria showed hyperplasia and hypertrophy of goblet cells, unlike infected animals that did not develop cerebral malaria. On the other hand, infected animals that developed non-cerebral malaria show a decrease in enterochromaffin cells. Also, a decrease in the expression of VIP mRNA was observed in the intestine of animals that developed cerebral malaria. These results suggest that *P. berghei* ANKA infection affects the intestines differently when animals develop cerebral malaria or not, and that decreased VIP mRNA expression may be involved in the changes in animals that develop cerebral malaria.

Keys words: *Plasmodium berghei* ANKA, Cerebral Malaria, intestine, enterochromaffin cells, goblet cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenvolvimento do <i>Plasmodium</i> ao longo do ciclo de vida.....	18
Figura 2.	Desenho experimental para desenvolvimento de Malária Cerebral.	29
Figura 3.	Avaliação do Escore RMCBS, variação do peso e parasitemia durante o desenvolvimento da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.	36
Figura 4.	Avaliação da hemoglobina, glicose e peso do baço durante o desenvolvimento da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.	37
Figura 5.	Avaliação histológica de cérebros de camundongos C57BL/6 /infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	38
Figura 6.	Avaliação histológica de cérebros de camundongos C57BL/6 /infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	39
Figura 7.	Avaliação de retenção gases gástricos e motilidade intestinal na infecção com <i>P. berghei</i> ANKA.	40
Figura 8.	Imagem representativa dos intestinos de animais C57BL/6 não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> ANKA apresentando Malária Cerebral e Malária não Cerebral....	41
Figura 9.	Mensurações de peso e comprimento dos intestinos de camundongos C57BL/6 durante a infecção com <i>P. berghei</i> ANKA.....	42
Figura 10.	Histologia do intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	43
Figura 11.	Avaliação de mastócitos no intestino de camundongos C57BL/6 delgado na infecção com <i>P. berghei</i> ANKA.....	43
Figura 12.	Detecção de camada de muco no intestino grosso de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	44
Figura 13.	Avaliação de células caliciformes e expressão do gene MUC-2 no intestino delgado de camundongo infectado com <i>P. berghei</i> ANKA.	45
Figura 14.	Avaliação de células enterocromafins e expressão mRNA para ChrgA e Tph-1 no intestino delgado de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	46
Figura 15.	Avaliação da expressão de mRNA dos genes Piezo-2, VIP, Notch-1 e Hes-1 no intestino delgado de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação da doença de malária entre homem e modelo experimental.....	21
Tabela 2.	Escore Rápido de Comportamento e coma murino .Erro! Indicador não definido.	
Tabela 3.	Grupos experimentais	30
Tabela 4.	Sequências de primers	34
Tabela 5.	Porcentagem de desenvolvimento malária	35

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

5-TH: hydroxytryptamine or Serotonin

AB/PAS: Alcian blue/PAS

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CEE- Células Enteroendocrinas

CSA- Chondroitin Sulfate A

d.i.- dia de infecção

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EC- Enterocromafins.

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GFP - Green Fluorescent Protein

H&E - Hematoxilina e Eosina

i.v- Intra venoso

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular-1

IL-13- Interleucina-13

m /v- Massa/Volume

MC- Malária Cerebral

MHC- Major Histocompatibility Complex.

MNC- Malária Não Cerebral

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MUC 2- Mucina 2

NI- Não infectado

P. berghei ANKA- *Plasmodium berghei* ANKA

p.i - pós-infecção

Pb- *Plasmodium berghei*

PBS - Tampão fosfato salino

pRBC. *parasitized red blood cells*

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

r.p.m- Revoluções por minuto

RMCBS- pelas suas siglas em inglês- Rapid Murine Coma and Behaviour Scale

SEM- Standard Error of the Mean

Tph 1- Tryptophan hydroxylase 1

TSP – trombospondina

VCAM-1- Molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISAO DA LITERATURA	16
2.1	Malária.....	16
2.2	<i>Plasmodium</i>	17
2.3	Malária cerebral.....	18
2.4	Modelo de malária experimental	19
2.4.1	Malária em camundongos	19
2.4.2	Camundongo como modelo experimental.....	20
2.4.3	Modelo de Malária Cerebral Experimental	21
2.5	Intestino	22
2.5.1	Intestino delgado	22
2.5.2	Células presentes no intestino	Erro! Indicador não definido.
2.6	Alterações intestinais na malária cerebral.	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Animais.....	28
4.2	Cepa do parasito e inóculo	28
4.3	Desenho experimental	28
4.4	Anestesia, eutanásia, coleta de amostras e órgãos.....	30
4.5	Parasitemia dos animais infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	31
4.6	Determinação dos níveis de hemoglobina.....	31
4.7	Quantificação dos níveis de Glicose no sangue.	31
4.8	Avaliação da motilidade intestinal pelo teste de carvão ativado	31
4.9	Análise de retenção gases gástricos (Teste de flotação).....	32
4.10	Análises histológicas	32
4.10.1	Histologia geral do intestino.	32
4.10.2	Quantificação de mastócitos.....	32
4.10.3	Análise de células caliciformes	32
4.10.4	Detecção de células enterocromafins	33
4.11	Análise da camada de Muco.....	33

4.12	Análise da expressão de mRNA no tecido intestinal.....	33
4.13	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Desenvolvimento da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA nos camundongos C57BL/6	35
5.2	Sinais de malária nos animais infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	37
5.3	Análise de retenção gases gástricos e motilidade intestinal durante a malária	39
5.4	Alterações no tamanho e peso do intestino durante a infecção com <i>P. berguei</i> ANKA ...	40
5.5	Análise histológica e detecção de Mastócitos no intestino delgado na infecção por <i>P. berghei</i> ANKA	42
5.6	Avaliação da camada do muco no intestino grosso e detecção de células caliciformes e avaliação da expressão do gene MUC-2 no intestino delgado de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	44
5.7	Detecção de células enterocromafins, e avaliação da expressão dos genes ChrgA e Tph-1 no intestino delgado de camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	45
5.8	Detecção de mRNA dos genes Piezo-2, VIP, Notch-1 e Hes-1 no intestino delgado de animais infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	46
6	DISCUSSÃO	48
7	Conclusões	53
8	Anexos.....	66

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença aguda e crônica causada pelos parasitos protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium*, transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos *Anopheles* (FAURE, 2014). Em 2020 houve 241 milhões de casos de malária, e estima-se que tenha causado 627.000 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Diferentes manifestações clínicas podem ocorrer durante a infecção por *Plasmodium*, que pode ser assintomática e também causar doença fulminante, dependendo da espécie, idade e estado imunológico do hospedeiro (ENGWERDA et al., 2005). Em particular, a malária cerebral (MC) resultante principalmente da infecção por *Plasmodium falciparum* é responsável pela maioria das mortes causadas pela malária.

P. falciparum é a espécie mais virulenta de *plasmodium* que infecta o homem porque pode invadir tanto eritrócitos maduros quanto precursores, o que gera um alto nível de parasitemia (LH et al., 2002; HORA et al., 2016; TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018). Alterações gastrointestinais também tem sido observadas durante a infecção por *P. falciparum*, como o aumento da presença de edema de mucosa, microtrombose, sangramento superficial, atrofia gástrica e metaplasia intestinal. Essas alterações explicam os sintomas gastrointestinais, como dor, vômito e diarreia, que têm sido associados à infecção por esse parasito (LEE; COBAN, 2020).

O estudo da malária cerebral levou ao desenvolvimento de modelos murinos com o objetivo de obter um melhor entendimento da doença, sendo que o modelo mais utilizado até agora é a infecção de camundongos C57BL/6 com *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) (REST, 1982a; ENGWERDA et al., 2005). Este modelo animal desenvolve os principais sintomas de doenças humanas, como convulsões, paralisias e ataques, o que permitiu estudar as diferentes alterações em diferentes órgãos, como cérebro, baço, pulmão, rins e fígado (HEARN et al., 2000; MARTINS et al., 2009; BASIR et al., 2012; HOWLAND et al., 2015). Estudos mostraram que camundongos jovens C57BL/6 (8 semanas) infectados com *P. berghei* ANKA desenvolvem os principais sintomas de malária cerebral logo após a infecção, apesar de apresentarem parasitemia relativamente baixa (HEARN et al., 2000). No entanto, a indução da malária cerebral experimental apresenta alguns desafios, pois nem todos os animais infectados desenvolvem a doença, que está associada tanto à cepa do camundongo quanto à quantidade e origem dos glóbulos vermelhos infectados inoculados (AMANI et al., 1998).

Alguns estudos têm buscado compreender a fisiologia do sistema gastrointestinal e as alterações na microbiota intestinal durante a infecção por *Plasmodium* (TANIGUCHI et al.,

2015; SHIMADA et al., 2019). A relação entre MC e distúrbios gastrointestinais pode estar relacionada à comunicação cérebro-intestino, que ocorre principalmente por meio da serotonina (5-TH), sendo que 95% desse hormônio é produzido e armazenado no sistema gastrointestinal em células enteroendócrinas, especificamente células enterocromafins (EC), e apenas 5% armazenados no sistema nervoso central (MARTIN et al., 2018b). Na parede do trato gastrointestinal encontra-se o plexo mioentérico, que apresenta uma variedade de receptores 5-TH que permite a comunicação entre o epitélio intestinal e os neurônios entéricos através de células EC (GRIBBLE; REIMANN, 2016). O plexo mioentérico tem um papel fundamental na regulação da motilidade gastrointestinal, peristaltismo e renovação do muco (HEARN et al., 2000). Este último, muco intestinal, é composto por mucinas, predominantemente MUC2, que são produzidas por células especializadas chamadas células caliciformes (TYTGAT et al., 1994).

Embora alguns estudos do sistema gastrointestinal durante a infecção por *P. berghei* ANKA tenham sido realizados, as alterações presentes ainda não foram descritas ou explicadas em profundidade. Por isso, decidimos investigar como a malária cerebral, doença que afeta o sistema nervoso central, afeta o trato gastrointestinal.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 Malária

A malária é uma doença parasitária causada pelo coccídio protozoário do gênero *Plasmodium*, que é transmitido pelo *Anopheles spp.* e capaz de infectar humanos e animais. Existem aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium* dos quais *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. malariae* causam malária em humanos. A sintomatologia da doença pode variar de acordo com a espécie do parasito, assim, *P. vivax* causa diversos sintomas, mas raramente é fatal, porém o *P. falciparum* causa a forma mais grave da doença, levando a milhões de mortes por ano (GOMES et al., 2018).

A malária é um problema significativo para as pessoas em áreas de vulnerabilidade social e sanitária como na África, Ásia e América Central e do Sul (PHILLIPS et al., 2017a). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou mais de 241 milhões de casos de infecção em 85 países e 627.000 mortes por malária em 2020 (LI; MANAGI, 2022). A África é responsável pelo maior número de casos com (88%), seguida pelo Sudeste Asiático (10%), região do Mediterrâneo Oriental (2%) e América Central e do Sul (<1%). No continente americano, em termos de incidência anual, o Brasil apresentou a quinta maior incidência de malária na América Latina depois de Guiana, Venezuela, Peru e Colômbia (GOMES et al., 2018).

Entre as espécies conhecidas por infectar humanos, *P. falciparum* é a mais letal, embora *P. vivax* tenha uma distribuição geográfica mais ampla (ADDERLEY et al., 2022). Além disso, *P. falciparum* é responsável por causar mais de 60% da malária presente em crianças entre 2-10 anos de idade (LI; MANAGI, 2022). No entanto, a infecção não necessariamente causa malária grave, pois a alta exposição ao parasito produz imunização, impedindo que a doença chegue a esse ponto (REAL; MANCIO-SILVA, 2022), ou seja, a malária grave ocorre principalmente em indivíduos que não possuem imunidade protetora, então geralmente ocorre em crianças maiores de 6 meses e menores de 5 anos, além de pessoas que estão em áreas de pouca exposição ao parasito (ADEYEMO et al., 2022).

Assim como a malária é causada por diferentes espécies de parasitos, a infecção pode causar vários sintomas, desta forma a doença pode ser classificada da seguinte forma (PHILLIPS et al., 2017b):

Malária assintomática: Como o próprio nome diz, não apresenta sintomas apesar de ter parasitos circulantes, este tipo de malária pode ser causado por todas as espécies de *Plasmodium spp.*

Malária não complicada: Assim como a anterior, pode ser causada por todos os *Plasmodium* spp. Os sintomas tornam-se inespecíficos e podem incluir febre, calafrios moderados a intensos, sudorese profusa, cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia e anemia, sem achados clínicos ou laboratoriais de disfunção orgânica grave.

Malária grave (complicada): está frequentemente associada à hiperparasitemia e aumento da mortalidade. Este tipo de malária é geralmente causado por infecção por *P. falciparum*, embora menos comumente também possa ser causado por *P. vivax* ou *P. knowlesi*. As complicações pela infecção incluem anemia grave e lesão de órgãos-alvo, além de coma, complicações pulmonares e hipoglicemia ou lesão renal aguda.

Malária placentária: quando há infecção durante a gestação e os parasitos estão presentes na placenta, levando a complicações para o feto e a mãe.

2.2 *Plasmodium*

Ciclo de vida de *Plasmodium*

Os parasitos do gênero *Plasmodium* têm ciclos de vida complexos devido a múltiplas transições fenotípicas envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. O ciclo de vida do parasito ocorre intra e extracelularmente, onde os principais locais de diferenciação e replicação compreendem o intestino médio das fêmeas de mosquitos *Anopheles*, hepatócitos no fígado e eritrócitos no sangue. *Plasmodium* também pode proliferar na medula óssea e no baço. Quando o mosquito pica, inocula através da pele os parasitos na forma de esporozoítos. Os esporozoítos tornam-se altamente móveis em resposta a uma mudança no ambiente, o que lhes permite migrar através do tecido até atingir um vaso sanguíneo onde entram na circulação sanguínea. Grande parte dos esporozoítos invade o fígado, nos hepatócitos, os parasitos se diferenciam e se multiplicam por esquizogonia para gerar milhares de merozoítos, que são liberados de volta na corrente sanguínea onde realizam ciclos de invasão eritrocitária e replicação intracelular (REAL; MANCIO-SILVA, 2022) (**Figura 1**).

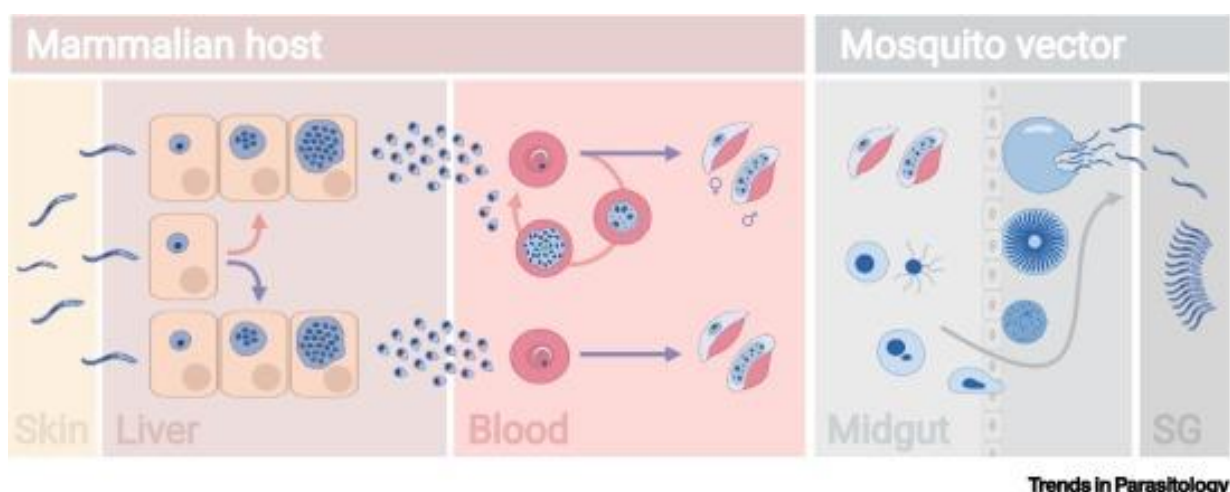


Figura 1. Desenvolvimento do *Plasmodium* ao longo do ciclo de vida.

Esquemas dos diferentes estágios fenotípicos e trajetórias de desenvolvimento de parasitos *Plasmodium* no hospedeiro mamífero e no mosquito vetor. Parasitos são mostrados em azul, hepatócitos em marrom claro e eritrócitos em vermelho. O desenvolvimento assexuado é representado por setas vermelhas, enquanto o compromisso e/ou desenvolvimento sexual são indicados por setas roxas. A fileira central de hepatócitos infectados representa o estágio latente de hipnozoíta de *Plasmodium vivax*. Abreviatura: SG, glândula salivar. (REAL; MANCIO-SILVA, 2022).

2.3 Malária cerebral

A malária cerebral (MC) é a forma mais grave e potencialmente letal das complicações associadas à malária, é causada pelo parasito *P. falciparum*, sendo que esta complicação da malária leva ao desenvolvimento de sequelas neurocognitivas e tem uma alta taxa de mortalidade (NGO-THANH et al., 2020; ASIEDU et al., 2022). A OMS define MC como uma síndrome clínica caracterizada por coma com a presença de formas assexuadas de *P. falciparum* no sangue periférico, quando há a exclusão de outros fatores que podem causar inconsciência, como outras infecções ou hipoglicemia (GHAZANFARI; MUELLER; HEATH, 2018).

A malária cerebral inclui o sequestro microvascular de eritrócitos infectados com *P. falciparum*, levando a processos cerebrais inflamatórios e perda da integridade da barreira hematoencefálica (NISHANTH; SCHLÜTER, 2019; ASIEDU et al., 2022). Esses processos são iniciados através da exposição ou adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio cerebral, desencadeando a resposta imune do hospedeiro gerando sinais inflamatórios (NISHANTH;

SCHLÜTER, 2019; ASIEDU et al., 2022). Também durante a malária cerebral, *P. falciparum* tem a capacidade de infectar eritrócitos imaturos, o que gera processos alterados da eritropoiese, além da infecção causar estresse oxidativo (TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018; NISHANTH; SCHLÜTER, 2019; ASIEDU et al., 2022).

2.4 Modelo de malária experimental

Modelos animais de doenças humanas são utilizados há muitos anos em diferentes áreas de pesquisa, constituindo uma das etapas fundamentais da biomedicina. São necessários tanto para projetos de pesquisa quanto em testes diagnósticos e terapêuticos e no controle de produtos farmacológicos (YUNTA, 2007). Os modelos experimentais têm permitido o desenvolvimento do conhecimento em diferentes áreas da ciência. No caso específico do estudo da malária, o modelo murino é uma importante ferramenta para compreender o desenvolvimento do parasito no hospedeiro e no vetor invertebrado, o comportamento da doença, a resposta imune do hospedeiro ao parasito e o desenvolvimento da vacina. O modelo experimental na malária cerebral compreende o uso do parasito *P. berghei* ANKA e do camundongo C57BL/6 (OCA; ENGWERDA; HAQUE, 2013).

2.4.1 Malária em camundongos

O início do modelo experimental para a malária ocorre a partir da descoberta dos parasitos do gênero *Plasmodium* que infectam roedores, em 1948, por pesquisadores da Universidade de Edimburgo, no Reino Unido, denominado *Plasmodium berghei* Vincke & Lips, 1948 (VINCKE; DE; 1948), isolado de um roedor originário da República Democrática do Congo na África (PATTARADILOKRAT et al., 2022). Posteriormente, outros parasitos do gênero *Plasmodium* têm sido isolados em diferentes partes da África. Inicialmente, a descrição das diferentes espécies de parasitos foi complexa porque morfológicamente são muito semelhantes, por isso, só a partir do desenvolvimento de técnicas moleculares foi possível demonstrar que os parasitos isolados de diferentes lugares da África eram realmente espécies diferentes, pois as novas técnicas permitiram analisar a variação de pesos moleculares e padrões enzimáticos, assim como determinar polimorfismos genéticos (CARTER, 1973). Foi assim que em 1973 foi demonstrado que *P. berghei* e *P. vinckei* correspondem a espécies diferentes. Posteriormente, as diferentes técnicas que foram surgindo permitiram a descrição do *P. chabaudi* Landau, 1965 (LANDAU, 1965), *P. yoeli* (LANDAU; KILLICK-KENDRICK, 1966) e *P. vinckei* Rodhain, 1952 (RODHAIN, 1952) e diferentes cepas atualmente reconhecidas.

A possibilidade de ter o parasito isolado sob condições controladas, assim como mantê-lo em camundongos de laboratório, tem permitido que cruzamentos genéticos mapeiem os genes do parasito e do hospedeiro, o que tem contribuído ao entendimento da infecção e da gravidade da doença. Em relação ao entendimento da malária, o isolamento da espécie *P. berghei* e a descrição de cepas como ANKA e NK65 foi muito importante, tendo em conta que mimetizam alguns efeitos da infecção em humanos como respostas inflamatórias excessivas. Além disso, cada cepa gera uma resposta diferente, é assim que o *P. berghei* ANKA é altamente virulento e gera sintomas cerebrais enquanto o NK65 não (PATTARADILOKRAT et al., 2022). Além dos sintomas neurológicos *P. berghei* ANKA também gera alterações histopatológicas, sequestro de hemácias infectadas nos vasos sanguíneos do cérebro de camundongos, o que acontece da mesma forma nos humanos. As características da infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos são as mais semelhantes às de humanos (**Tabela 1**), embora esse modelo não compartilhe todas as sintomatologias da malária cerebral humana, tornando-se o parasito mais utilizado no modelo experimental de malária cerebral (YAÑEZ et al., 1999; GRIFFITH et al., 2007; TANIGUCHI et al., 2015; SHIMADA et al., 2019).

2.4.2 Camundongo como modelo experimental.

O modelo de camundongo tem sido amplamente estudado devido às muitas semelhanças entre a via de resposta imune e os antígenos da malária definidos em parasitos murinos e humanos (BASIR et al., 2012). Embora tenha limitações em mimetizar todas as características da doença humana, a maior parte do conhecimento atualmente disponível é basicamente baseado em dados de modelos animais (BASIR et al., 2012). O modelo mais comum da Malária é camundongo infectado com *Plasmodium* o qual pode gerar malária cerebral quando a linhagem do camundongo é susceptível a cepa do parasito *P. berghei* ANKA, e embora a maioria das linhagens de camundongos sejam suscetíveis à malária cerebral (CBA/ca, CBA/J, CBA/HN, C57BL/6J, C57BL/6N, SLJ/J, 129/Ola, Swiss y NMRI), existem algumas linhagens que podem apresentar resistência à infecção e não gerar malária cerebral, como C3H, BALB/c, DBA/2 y 129Sv/ev (ENGWERDA et al., 2005). Os camundongos ICR e C57BL/6 são cepas suscetíveis para o desenvolvimento de malária cerebral, e são usados como modelo experimental, porém, camundongos ICR geram malária cerebral com altos níveis de parasitemia 60-80% (BASIR et al., 2012), enquanto C57BL/6 apresenta parasitemias muito mais baixas (CARROLL et al., 2010; OCA; ENGWERDA; HAQUE, 2013; TANIGUCHI et al., 2015). Portanto, o modelo mais utilizado e melhor descrito compreende o uso de C57BL/6 infectado com o parasito da malária de roedores, *P. berghei* ANKA. (REST, 1982b; CARROLL et al., 2010; OCA; ENGWERDA; HAQUE, 2013).

2.4.3 Modelo de Malária Cerebral Experimental

O modelo experimental de malária cerebral utilizando-se o camundongo C57BL/6 infectado com *P. berghei* ANKA é um dos melhores descritos e desenvolve a doença mais semelhante ao humano. O desenvolvimento da doença em humanos compartilha a maioria das características física, comportamental, imunológica, biológica e histopatológicas no cérebro, como se apresenta na **Tabela 1**, embora, um dos sintomas que diferem, é a presença de febre, no modelo animal a hipotermia é apresentada ao invés de febre (TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018).

Tabela 1. Comparação da doença malária entre homens e modelo experimental murino. Comparação das características da doença do cérebro humano com malária vs. malária cerebral no modelo experimental camundongo infectado com *P. berghei*. Tabela retirada e traduzida de (TORRE; LANGLAIS; GROS, 2018)

Parâmetro	MC Humano	MC Experimental
<u>Físico e comportamental</u>		
convulsões, paralisia, ataques.	+	+
Febre	+	-
Hipotermia	-	+
<u>Histopatologia cerebral</u>		
Astrócitos e mudanças na micróglia	+	+
Sequestro de pRBCs	+	+
Sequestro de leucócitos	+	+
Sequestro de plaquetas	++	+
Protuberâncias semelhantes a botões em pRBCs	+	-
Hemorragia parenquimatosa	+	+
Danos neuronais	+	+
Edema	+	+
<u>Imunológico</u>		
Expressão de citocinas pró-inflamatórias	+	+
Superexpressão de moléculas de MHC Classe I e II	+	+
Regulação positiva da molécula de adesão celular	ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, TSP, CSA, ácido hialurônico.	ICAM-1, VCAM-1
<u>Bioquímico</u>		
Aumento de lactato	+	+
Aumento dos metabólitos da via da quinurenina	+	+

*Presente em crianças com MC da África Subsaariana, mas não relatado em MC adulto

pRBCs: Sigla do inglês *parasitized red blood cells*; **pRBC**. *parasitized red blood cells* MHC, *Major Histocompatibility Complex*;

CSA- *Chondroitin Sulfate A*; **ICAM-1**: *Intercellular Adhesion Molecule 1*; **VCAM-1**- *vascular cell adhesion molecule 1*;

TSP – *trombospondina*

Para esse modelo Carroll et al 2010, desenvolveram uma escala quantitativa e rápida de comportamento e coma murino (RMCBS), que permite ao pesquisador acompanhar cada animal rapidamente. Isso foi projetado para avaliar cada animal em 3 minutos e é composto por 10 parâmetros (andar, equilíbrio, desempenho motor, posição corporal, força dos membros, escape ao toque, reflexos auditivos, reflexos digitais, agressividade e higiene), cada parâmetro é pontuado de 0 como o mais baixo, para 2 como o mais alto, com uma pontuação máxima possível de 20, então, a mínima pontuação indica a presença da malária cerebral. Os autores relataram que animais infectados com 1×10^6 hemácias infectadas com parasito *P. berghei* ANKA, desenvolvem sintomas neurológicos e evoluem rapidamente para a morte dentro de 5 a 10 dias da infecção, apresentando parasitemia relativamente baixa. Além disso, eles associaram os parâmetros com alterações histopatológicas. A importância deste modelo está em que o desenvolvimento da doença pela infecção do parasito é independente em cada indivíduo porque a idade e o sistema imunológico do animal podem influenciar a severidade da doença.

2.5 Intestino

O trato intestinal é um dos órgãos mais complexos do corpo em relação ao seu funcionamento e arquitetura e é subdividido em cinco domínios funcionais ao longo do eixo proximal para distal: duodeno, jejuno e íleo no intestino delgado, e o ceco e o cólon que formam o intestino grosso (HOUNNOU et al., 2002). O intestino compreende tipos especializados de células e tecidos de todas as três camadas germinativas. Os tecidos intestinais incluem epitélio derivado do endoderma, que abriga células-tronco intestinais especializadas (SATO; CLEVERS, 2013), músculo liso derivado do mesoderma, vasculatura, células linfáticas e imunes e o sistema nervoso entérico derivado do ectoderma (WELLS; SPENCE, 2014). Contribuições de todas as camadas germinativas são necessárias para ajudar a coordenar uma infinidade de funções intestinais (WELLS; SPENCE, 2014).

2.5.1 Intestino delgado

O intestino delgado é especializado em funções digestivas e absorptivas, apresenta vilosidades em toda sua extensão. A digestão requer um pH neutro que é alcançado pelas secreções das glândulas de Brunner e do pâncreas exócrino. O intestino delgado é dividido em três regiões:

Duodeno: é a porção proximal adjacente ao estômago. Apresenta vilosidades altas e delgadas que se estendem até o lúmen. No duodeno também estão as glândulas de Brunner, as quais estão localizadas na submucosa.

Jejuno: é a porção intermediária, as vilosidades são altas e delgadas que se estendem até o lúmen, não apresenta glândulas na submucosa.

Íleo: é a porção distal adjacente ao intestino grosso. Apresenta vilosidades curtas e largas com extremidades rombas que se estendem para dentro do lúmen; não apresenta glândulas na submucosa (TREUTING; VALASEK; DINTZIS, 2012).

2.5.2 *Diferentes populações de células intestinais*

O intestino é revestido por um epitélio simples, formado por uma monocamada de células epiteliais. Essas células são originárias de células-tronco multipotentes presentes nas criptas, dentre elas estão: enterócitos, células de Paneth, células caliciformes e células enterocromafins (NOAH; SHROYER, 2013).

2.5.2.1 *Enterócitos*

São as principais células intestinais, absorptivas que constituem > que 80 % de todas as células epiteliais do intestino delgado (CHENG; LEBLOND, 1974; SNOECK; GODDEERIS; COX, 2005). Enterócitos desempenham um papel na absorção de nutrientes, e atuam como uma barreira à entrada de micróbios e toxinas do lúmen para o tecido, podem secretar citocinas e quimiocinas em resposta a sinais inflamatórios. Por meio dessa secreção, os enterócitos podem ativar e recrutar células inflamatórias e imunes, podendo também atuar como células apresentadoras de antígenos quando são estimuladas (CHOUGULE et al., 2012).

2.5.2.2 *Células de Paneth*

As células de Paneth são células epiteliais altamente especializadas do intestino delgado, povoam a base das criptas de Lieberkühn, as quais são pequenas invaginações que revestem a superfície da mucosa ao longo do intestino (PORTER et al., 2002; STAPPENBECK, 2009). Tem uma morfologia única caracterizada por um extenso retículo endoplasmático e rede de Golgi que direcionam grandes e densos grânulos secretores para a membrana apical (OUELLETTE, 2010; CLEVERS; BEVINS, 2013). Os grânulos secretores das células de Paneth são ricos em diversas proteínas e peptídeos de defesa do hospedeiro, lisozima, proteína de ligação ao lipopolissacarídeo, RegIII- γ e xantina oxidase, metaloproteinase de matriz 7 (MMP7), ligante CD95, IgA acho que não, CD1d, polipeptídeo intestinal rico em cisteína, CD15 e metalotioneína, e uma série de mediadores pró-inflamatórios que incluem interleucina-

17^a (IL-17^a), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e lipocinas (PORTER et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2008; STAPPENBECK, 2009; OUELLETTE, 2010). No intestino delgado, a fonte primária, mas não exclusiva, de proteínas e peptídeos antimicrobianos presentes no lúmen são as células de Paneth. Essas proteínas provavelmente moldam a composição das espécies e a abundância dos micróbios locais que residem no lúmen do intestino, além de desempenhar um papel na eliminação de patógenos potenciais (STAPPENBECK, 2009).

2.5.2.3 Células caliciformes

As células caliciformes são células epiteliais intestinais secretoras, especializadas na síntese e secreção de mucinas formadoras de gel. As camadas de mucina cumprem as funções de lubrificação e barreira física, mediante a criação de estruturas semelhantes a redes que são impenetráveis às bactérias (BIRCHENOUGH et al., 2015). Existem dois tipos de camadas de mucina: uma camada fixa (ou firme) e uma camada solta, normalmente, o intestino delgado contém uma única camada de muco que não está ligada aos enterócitos, enquanto o cólon possui duas camadas de muco, a camada interna serve para separar as células epiteliais intestinais das bactérias presentes na camada mucosa externa (ATUMA et al., 2001; JOHANSSON et al., 2008; BIRCHENOUGH et al., 2015). Entre várias moléculas da família das mucinas, MUC2 é a mais abundante nos grânulos secretores das células caliciformes e representa a primeira grande glicoproteína clonada (ALLEN; HUTTON; PEARSON, 1998). A importância das células caliciformes na proteção da mucosa intestinal é destacada pelos papéis de dois produtos de células caliciformes, MUC2 e o peptídeo *trefoil factor 3* (TFF3) (KURASHIMA; KIYONO, 2017).

2.5.2.4 Células enterocromafins

O epitélio intestinal está geralmente associado à absorção de nutrientes e função de barreira. As células enteroendócrinas (CEEs) constituem apenas 1% do epitélio intestinal e são células produtoras de hormônios que controlam os principais processos fisiológicos relacionados à ingestão alimentar, secretando mais de 20 peptídeos diferentes (BEUMER; GEHART; CLEVERS, 2020). Os hormônios são produzidos em uma célula individual e quando estimulada causa a liberação dependendo do tipo de CEE e mudam ao longo da vida de uma célula enteroendócrina individual (BEUMER; GEHART; CLEVERS, 2020). Classicamente, os CEEs são distinguidas pelo principal hormônio que secretam: células enterocromafins (EC) (serotonina, 5-HT), células I (colecistocinina, CCK), células K (peptídeo inibitório gástrico, GIP), células L (peptídeo semelhante ao glucagon 1, GLP-1), células X (grelina, GHRL), células S (secretina, SCT), células D (somatostatina, SST) e células N

(neurotensina, NTS) (DIWAKARLA et al., 2017; HABER et al., 2017). O repertório hormonal de uma célula individual é limitado pela linhagem enteroendócrina e gastrointestinal (BEUMER; GEHART; CLEVERS, 2020). As células enterocromafins (EC) são o subtipo mais abundante de células enteroendócrinas intestinais, que podem entrar em contato direto com o lúmen intestinal e interagir com as terminações nervosas aferentes e eferentes localizadas na lâmina própria por meio de conexão sináptica (REZZANI et al., 2022). Embora representem menos que 1% das células epiteliais intestinais, podem produzir e liberar 90% da serotonina do corpo, que é essencial para a motilidade intestinal, função plaquetária, resposta imune e desenvolvimento ósseo (Revisado em XU et al., 2021). As células EC produzem a Cromogranina A (ChrgA), que é uma proteína solúvel que compõe maioritariamente os grânulos de secreção destas células (VARNDELL et al., 1985).

2.5.2.5 Mastócitos

Os mastócitos são células importantes do sistema imunológico, encontradas nos tecidos conjuntivos de todo o corpo, em particular, na pele, perto dos vasos sanguíneos e linfáticos, dos nervos, dos pulmões e intestinos (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Eles têm uma aparência arredondada e seus grânulos apresentam metacromasia (assumem uma cor diferente da apresentada pelo corante) (FONG; CRANE, 2022). Os mastócitos desempenham um papel importante na resposta do sistema imunológico a certas bactérias e parasitos, também ajudam a controlar outros tipos de respostas imunes e contêm substâncias químicas como histamina, heparina, citocinas e fatores de crescimento (SHIMOKAWA et al., 2017).

Os mastócitos estão localizados nas camadas mucosa e submucosa em todo o trato intestinal e são frequentemente observados próximos das terminações nervosas dos neurônios sensoriais e autônomos. Os mastócitos são classificados como células mastocitárias da mucosa ou mastócitos de tecido conjuntivo, são morfológica, bioquímica e funcionalmente distintos dos mastócitos do tecido conjuntivo (GURISH; AUSTEN, 2012). Tem sido relatado que existem dois tipos de degranulação em mastócitos: degranulação rápida geral e degranulação constante fragmentada. Supõe-se que a degranulação rápida geral é dominante em mastócitos de tecido conjuntivo, enquanto a degranulação constante aos poucos pode ser dominante em mastócitos de tecido da mucosa (ABDELLAH et al., 2018; KADOWAKI; YAMAMOTO; HAYASHI, 2022).

2.6 Alterações intestinais na malária cerebral.

A malária em humanos pode causar sérios distúrbios em os diferentes órgãos como nos pulmões, coração, fígado, baço, rins e intestinos (KEVIN BAIRD, 2013). Embora, durante a infecção são comuns os danos cerebrais e distúrbios respiratórios, os sintomas gastrointestinais predominam (FAURE, 2014). Tem sido evidenciado que a infecção por *P. falciparum* pode apresentar altos níveis de parasitas nos vasos sanguíneos das membranas mucosas do intestino delgado, com relativamente poucos parasitas no resto do corpo (FAURE, 2014). A presença de sintomas gastrointestinais levou à avaliação de alterações gastrointestinais durante a infecção por plasmódio em diferentes modelos experimentais. Assim foi avaliado o *Plasmodium chabaudi* ao infectar camundongos C57BL/6, constatando que quando há desnutrição e infecção pelo parasita, ocorrem alterações intestinais como deformidade das células epiteliais e permeabilidade intestinal (MURR et al., 2021). Verificou-se também que uma única infecção com *P. chabaudi* levou a um aumento de TNF, IL-6 e IL-10 no cólon, mas não afetou a produção de citocinas no ceco (DOS SANTOS et al., 2021). Por outro lado, no modelo experimental de malária cerebral com *P. berghei* ANKA, em camundongos C57BL/6 com 7-8 d.i., foram encontradas alterações como encurtamento do intestino, retenção de gases, perda da permeabilidade intestinal, além de alterações da mucosa, como edema, afinamento da mucosa e muscular, aumento das células caliciformes e oclusão dos vasos sanguíneos (TANIGUCHI et al., 2015; SHIMADA et al., 2019).

Embora alguns estudos a respeito de sintomas/alterações gastrointestinais durante a infecção por *P. berghei* ANKA tenham sido realizados, os mecanismos envolvidos nessas alterações ainda não foram elucidados. Além disso, não tem reportado se as alterações intestinais estão relacionadas com o desenvolvimento da infecção. É dizer, se apresenta diferenças nas alterações intestinais quando se desenvolve malária cerebral ou não. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar como a infecção por *P. berguei* ANKA afeta o intestino quando se desenvolve a malária cerebral ou não.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações intestinais no modelo de malária cerebral experimental em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolvem malária cerebral ou não.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o escore de morbidade em animais infectados com *P. berghei* ANKA;
- Mensurar a parasitemia dos animais infectados com *P. berghei* ANKA durante o desenvolvimento da doença;
- Avaliar a presença de gases gastrointestinais e o trânsito intestinal dos animais infectados que desenvolvem malária cerebral ou não, em relação aos não infectados;
- Dosar hemoglobina e glicose no sangue dos animais infetados com *P. berghei* ANKA;
- Analisar as alterações histológicas no intestino de animais infectados que desenvolvem malária cerebral ou não;
- Quantificar os mastócitos no intestino de animais infectados e não infectados;
- Quantificar as células caliciformes e mensurar as vesículas de secreção das mesmas em animais infectados e não infectados;
- Detectar a camada de muco no intestino grosso de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA;
- Detectar e quantificar as células enterocromafins no intestino de animais que desenvolvem malária cerebral ou não, e animas não infectados;
- Analisar a expressão de *Mucina 2* (Muc2), *Triptofano hidroxilase* (Tph1), *Cromogranina A* (ChrgA), *Peptídeo intestinal vasoativo* (VIP), *Receptor Notch 1* (NOTCH-1), *Interleucina-13* (IL-13), *PIEZO-2* e *HES-1* por PCR quantitativa (qPCR) em tecido intestinal de animais infectados e não infectados;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Em todo o estudo foram utilizados 49 Camundongos C57BL/6 fêmeas de 7-8 semanas de idade, os quais foram criados e mantidos em condições específicas livres de patógenos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C), ciclos claro/escuro de 12 h e livre acesso a ração e água. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas éticas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob protocolo de número 050/21 (**ANEXO 1**).

4.2 Cepa do parasito e inóculo

A cepa *P. berghei* ANKA, expressando a proteína fluorescente *green fluorescent protein* (GFP), foi usado para infectar os animais neste estudo. Com a finalidade de preparar inóculos com carga parasitaria conhecida e padronizada para todos os animais dos grupos experimentais, hemácias infectadas com a cepa de *P. berghei* ANKA foram mantidas em nitrogênio líquido e descongeladas para infectar camundongos C57BL/6 fêmeas pela via intravenosa (i.v.) (plexo retro orbital). Amostras de sangue da cauda destes animais foram coletadas para avaliar a porcentagem de parasitemia. Quando as fêmeas atingiram parasitemia de 1-2 %, o sangue foi coletado e alíquotas de parasitos com 1×10^5 hemácias infectadas foram preparadas em um volume final de 100 μ L cada, ressuspensas em 10% de glicerina e PBS. As alíquotas foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso. Sendo assim, após descongelamento do inóculo os animais do grupo experimental foram infectados com 100 μ L do mesmo por via i.v. e os animais controles não infectados foram inoculados com 100 μ l de PBS.

4.3 Desenho experimental

Para a avaliação do intestino durante a malária cerebral, camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa *P. berghei* ANKA. O efeito da infecção foi comparado com camundongos C57BL/6 não infectados (NI), sob as mesmas condições experimentais. Após o quarto dia de infecção até o momento da eutanásia os animais foram monitorados para análise da parasitemia. Para isso, amostras de sangue foram coletadas da cauda e fixadas em formaldeído 4%. As amostras foram armazenadas a 4 °C até a análise em citômetro de fluxo. Além disso a sobrevivência, perda percentual de peso e sinais clínicos dos animais foram avaliados diariamente a partir do dia 4 após a infecção (p.i.). Os sinais clínicos específicos da

malária cerebral experimental, foram avaliados de acordo com a Escala Rápida de Coma e Comportamento Murino (RMCBS - *Rapid Murine Coma and Behaviour Scale*) (**Figura 2**).

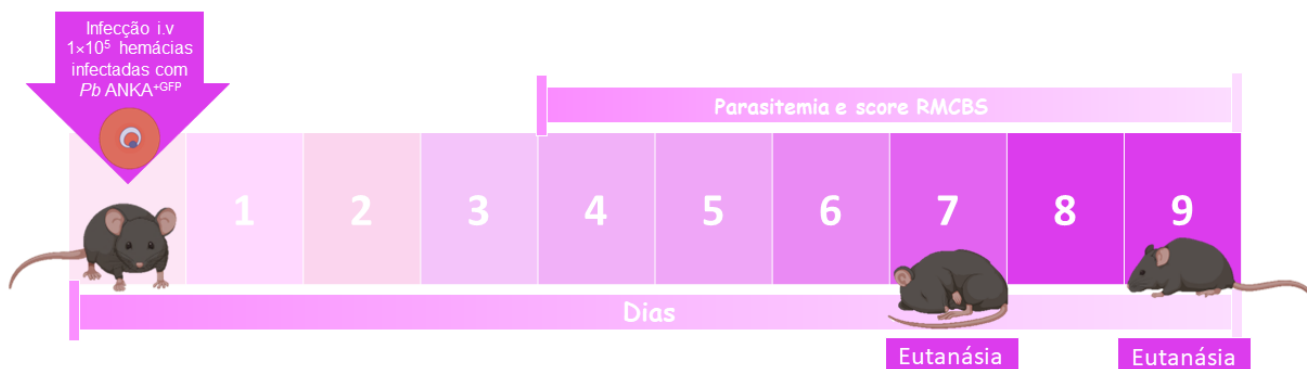


Figura 2. Desenho experimental para desenvolvimento de Malária Cerebral.

A figura representa o desenho experimental, desde o dia de infecção dos animais C57BL/6, com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA ^{+GFP} (sinalado com a seta), até o último dia de eutanásia. O dia 7 representa o primeiro dia de eutanásia quando os animais desenvolvem malária cerebral de acordo com a pontuação do score. E o dia 9 a segunda eutanásia dos animais que não desenvolvem malária cerebral.

A RMCBS é uma escala quantitativa que avalia dez parâmetros (andar, equilíbrio, desempenho motor, posição corporal, força dos membros, fuga ao toque, reflexo do pavilhão auricular, pinça do dedo do pé, agressão e higiene) e é pontuado de 0 a 20, onde a pontuação de 0 corresponde ao animal mais doente e 20 a pontuação em animal saudável (CARROLL et al., 2010).

Tabela 2. 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 aperto (0); aperto fraco, apenas das patas frontais (1); aperto forte (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)	Despenteadado, com faixas de pelo fora de lugar (0), empoeirado/arrepiado (1), normal/ limpo e com brilho (2)

(CARROLL et al., 2010)

Os animais foram eutanasiados quando a escala de comportamento indicava a presença de malária cerebral (pontuação de 5 ou menos, animais em coma), ou no dia 9 p.i pois os animais que sobreviveram neste dia não desenvolveriam a malária cerebral e foram considerados como animais com malária anêmica, os animais não infectados foram eutanasiados entre os dias 7 e 9 (**Tabela 3**). Desta forma os animais foram divididos em três grupos:

Tabela 3. Grupos experimentais

GRUPO	ABREVIACÃO	DESCRIÇÃO
Malária Cerebral	MC	Animais com pontuação de RMCBS ≤ 5 .
Malária Não Cerebral	MNC	Animais com 9 dias de infecção e pontuação do RMCBS de 16 ± 1 .
Não Infectado	NI	Animais não infectados.

4.4 Anestesia, eutanásia, coleta de amostras e órgãos

Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com Xilazina 10 mg/Kg e Cetamina 100 mg/Kg (Vetnil, Louveira, SP, Brasil) administradas por injeção intraperitoneal (i.p). No momento da eutanásia se fez observação macroscópica e registro fotográfico dos intestinos. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para dosagem de hemoglobina. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O intestino delgado e o intestino grosso foram mensurados e pesados e as características macroscópicas foram documentadas. O intestino delgado foi coletado, cortado e dividido em quatro porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo), e cada porção foi enrolada sobre si mesma para fazer um “rolo suíço”, para análises histológicas em toda sua extensão. Além disso, o cérebro e baço também foram coletados, o baço foi pesado e o cérebro foi coletado para análise histológica. Os órgãos coletados para histologia foram fixados em formol tamponado a 10% e processados rotineiramente para inclusão em parafina e seccionamento. O sangue do animal foi coletado pelo plexo retro orbital no momento da eutanásia com o animal anestesiado, posteriormente foi centrifugado para separar o soro para análise de glicemia, o qual foi coletado e mantido a -80°C . Além disso, fragmentos de tecido intestinal (o íleo próximo ao jejuno distal), cérebro (hemisfério esquerdo) e colón (porção mais próxima ao seco) foram coletados para análises de biologia molecular, sendo anteriormente lavados em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e acondicionados em micro tubos, os quais imediatamente foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C até o momento do uso.

4.5 Parasitemia dos animais infectados com *P. berghei* ANKA

A parasitemia dos animais foi avaliada por citometria de fluxo desde o dia 4 p.i até o dia da eutanásia. Para tal fim, foram coletadas aproximadamente duas gotas do sangue da cauda dos camundongos, e ressuspensas em 500 μ L de PBS estéril para depois serem centrifugadas a 3500 r.p.m durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet de hemácias foi ressuspendido em 500 μ L de formaldeído 4% em PBS. As amostras de sangue da cauda foram avaliadas em citômetro Cytoflex flow (Beckman Coulter, United States), estabelecendo um gate para a separação de hemácias de outras células de acordo com tamanho e granularidade. Em seguida, as hemácias infectadas foram detectadas de acordo com a fluorescência emitida pelos parasitos intracelulares. Um total de 50.000 células foram avaliadas, e os resultados foram analisados no software CytExpert.

4.6 Determinação dos níveis de hemoglobina

Os níveis de hemoglobina foram determinados no dia da eutanásia a partir das amostras de sangue dos camundongos infectados e não infectados usando um kit comercial seguindo as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG). Para essa análise, 20 μ l de sangue foram coletados da cauda dos animais, a absorbância para a dosagem de hemoglobina foi lida em comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States). Os resultados foram expressos em g/dL.

4.7 Quantificação dos níveis de Glicose no sangue.

Os níveis de glicose no sangue, foram determinados no dia de eutanásia das amostras de soro dos camundongos infectados e não infectados, usando um kit comercial seguindo as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG). Para a realização do ensaio foi utilizado 5 μ l de soro dos animais, e a absorbância para a dosagem de glicose foi mensurada em comprimento de onda de 505 nm num leitor de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States) e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.8 Avaliação da motilidade intestinal pelo teste de carvão ativado

Para avaliação da motilidade intestinal os animais do grupo NI e animais do grupo infectado foram previamente colocados em jejum por 12 horas, e em seguida estes animais receberam 200 μ L de suspensão de carvão ativado (5% de carvão ativado em solução de carboximetilcelulose a 0.5%, m/v) por via oral (DE REZENDE et al., 2021). Após 45 min de

administração de carvão, os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente, e o intestino delgado foi removido para determinar a distância percorrida pelo carvão ativado. Os resultados do trânsito intestinal foram expressos como a relação entre o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado (HARRISON et al., 2004; UDDIN et al., 2005).

4.9 Análise de retenção gases gástricos (Teste de flotação)

Para avaliar a disfunção do trato gastrointestinal durante a MC, foi analisada a retenção de gases no estômago. Para isso, o trato gastrointestinal foi coletado desde a parte final do esôfago até o reto do camundongo, tendo precaução de não pinçar e deixar sair os gases intestinais que poderiam estar presentes. Posteriormente, foram dispostos em um tubo de centrífuga de 50mL contendo PBS e foi observado se os órgãos apresentavam flutuação ou não. A retenção de gases foi mensurada a partir da distância de flutuação do estômago, considerando a graduação do tubo. Os dados foram representados como % da distância de flutuação, sendo 100% de flutuação o volume máximo do tubo.

4.10 Análises histológicas

Para análises histológicas, as seções de tecido dos intestinos delgado e grosso foram seccionadas a uma espessura de 4 µm em micrótomo (Leica RM2125 RTS), posteriormente coradas para os diferentes análises histológicas descritas abaixo.

4.10.1 Histologia geral do intestino.

Os intestinos foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para a observação da estrutura histológica do tecido, alterações estruturais e presença de inflamação.

4.10.2 Quantificação de mastócitos

Para a quantificação de mastócitos seções teciduais do intestino delgado foram coradas com Azul de Toluidina (AT). O número de mastócitos foi obtido a partir da análise de 50 campos por porção intestinal, totalizando 200 campos microscópicos por animal. Os tecidos foram analisados utilizando a objetiva de 40x de aumento.

4.10.3 Análise de células caliciformes

Para a análise das células caliciformes, os cortes de tecido foram corados com Alcian blue (AB). O número de células caliciformes foi mensurado em 100 vilosidades por porção de intestino para um total de 400 vilosidades por animal, utilizando uma objetiva de 40x. Além

disso, a área das porções secretoras das células caliciformes de 20 vilosidades aleatórias por intestino foi mesurada usando o software QuPath 0.3.2.

4.10.4 Detecção de células enterocromafins

As células enterocromafins foram detectadas com a coloração de prata de acordo com GRIMELIUS (2004), com modificações. Brevemente, secções do intestino delgado foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcoois de concentrações decrescentes seguida por passagem em água. Posteriormente os cortes foram incubados em solução de impregnação (água destilada com 70 mg de nitrato de prata) a 60°C durante 3 horas, e transferidos para solução de redução (1% de hidroquinona e 5% de sulfito de sódio anidro dissolvido em solução tampão de Walpole 1:20, m /v) pré-aquecido a 60°C por 1 minuto, onde em seguida foram contra coradas com safranina. Para a quantificação das células enterocromafins foram analisados 50 campos por porção intestinal, totalizando 200 campos teciduais por camundongo, usando uma objetiva de 40x.

4.11 Análise da camada de Muco

Para o análise da camada do muco no intestino grosso, o tecido foi coletado e fixado imediatamente após ser retirado do animal, todo o conteúdo intestinal foi preservado. A fixação foi feita com metacarnoy (60% metanol, 30% cloroformio% e 10% Ácido acético glacial) a 4°C durante 2 horas, depois incubado por uma hora em etanol absoluto a 4°C, onde posteriormente foram feitos 3 banhos no xilol por 10 minutos, seguido pela inclusão em parafina. O tecido foi seccionado com uma espessura de 5 µm e corado com Alcian blue.

4.12 Análise da expressão de mRNA no tecido intestinal

A extração de RNA foi realizada utilizando amostras de tecido intestinal (Íleo). Estas amostras foram pulverizadas utilizando nitrogênio líquido, e foram em seguida homogeneizadas em 1000 µL TRIzol ® (Life Technologies, Carlsbad, USA) com auxílio de um homogeneizador (IKA Works GmbH & Co. KG-Staufen– Alemanha). A extração do RNA total foi realizada conforme instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram mensuradas no equipamento NanoDrop (1000, Thermo). Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por transcrição reversa ImPromII™ (Promega, Madison, WI, EUA) realizada no termociclador (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA). A reação de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no

equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies) utilizando o Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA). Foram utilizadas sequências de primers específicas para cada gene alvo (Tabela 4). Os dados da expressão gênica foram analisados em relação ao gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), esses resultados foram normalizados em relação ao grupo NI usando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4. Sequências de primers

Nome do gene	Sequência do primer
<i>ChrgA</i>	Forward 5'-3' CCAAGGTGATGAAGTGCCTC Reverse 5'-3' GGTGTCGCAGGATAGAGAGGA
<i>Tph-1</i>	Forward 5'-3' CACGAGTGCAAGCCAAGGTTT Reverse 5'-3' AGTTTCCAGCCCCGACATCAG
<i>VIP</i>	Forward 5'-3' TGTGCTGTTCTCTCAGTCGC Reverse 5'-3' AAACGGCATCCTGTCATCCA
<i>Muc-2</i>	Forward 5'-3' TGCTGTGTTTGGAAGGCTG Reverse 5'-3' TAGGCTGGTTATCTGCTGAC
<i>Notch-1</i>	Forward 5'-3' AGCAAGAAGAAGCGGAGAGAGC Reverse 5'-3' TGTCGTCCATCAGAGCACCATC
<i>Piezo-2</i>	Forward 5'-3' GCACTCTACCTCAGGAAGACTG Reverse 5'-3' CAAAGCTGTGCCACCAGGTTCT
<i>Hes-1</i>	Forward 5'-3' GGAGAGGCTGCCAAGGTTTT Reverse 5'-3' GCAAATTGGCCGTCAGGA
<i>IL-13</i>	Forward 5'-3' GAGCAACATCACACAAGACCAGA Reverse 5'-3' GAATCCAGGGCTACACAGAACC

4.13 Análise estatística

A análise estatística e gráficos foram feitas com o programa *GraphPad Prism* versão 8.0 (GraphPad Software). Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os dados que apresentaram distribuição paramétrica foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de comparação de Sidak. Os dados que apresentaram distribuições não paramétricas foram analisados com o teste de Krustal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para análise entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6

Para o modelo de malária cerebral, utilizamos o inóculo 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA buscando obter um número considerável de animais que desenvolvem malária cerebral. Infectamos um total de 49 animais em todo o trabalho, dos quais 37 desenvolveram malária cerebral, ou seja, 75,63% entre os quatro experimentos realizados (**Tabela 5**). Os animais que desenvolveram malária cerebral foram consequentemente considerados no grupo de malária cerebral (MC) e os que não a desenvolveram foram atribuídos ao grupo de malária não cerebral (MNC). 5 animais não infectados foram utilizados por experimento realizado.

Tabela 5. Porcentagem de desenvolvimento de malária

	Malária cerebral (MC)	Malária Não Cerebral (MNC)
Porcentagem de animais inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com <i>P. berghei</i> ANKA	75,63 %	24,38 %

Para acompanhar o desenvolvimento da infecção, os camundongos infectados foram monitorados para análise de sinais clínicos de malária cerebral desde o dia 4 após a infecção. A partir do dia 5 p.i., foram observados parâmetros como ataxia e pelos eriçados, e no dia 7 p.i., os animais desenvolveram ataxia progressiva, paralisia, perda da força dos membros e do reflexo digitais, pelagem despenteado e chegaram ao coma, ou tiveram escore de 4 RMCBS. Por outro lado, os animais que sobreviveram até o dia 9 apresentaram os primeiros sintomas descritos, mas não desenvolveram progressão da doença, com escore médio de 16 RMCBS (**Figura. 3A**).

Camundongos infectados apresentaram perda de peso progressiva durante os dias de infecção. Os animais que desenvolveram MC perderam até 8% do seu peso corporal no dia 7 p.i., entretanto, embora os animais com MNC tenham perdido peso semelhante no dia 7 p.i., eles recuperaram em média 4,7% do peso, no dia 9 p.i. (**Figura. 3B**).

Alterações na parasitemia periférica foram avaliadas em animais infectados com *P. berghei* ANKA a partir do dia 4 p.i. até o dia 7 p.i (para animais que desenvolveram MC) ou até o dia 9 p.i (para animais com MNC). A porcentagem de células sanguíneas infectadas foi quantificada por citometria de fluxo. Camundongos infectados apresentaram um aumento progressivo da parasitemia. No entanto, os níveis de parasitemia foram maiores nos animais

que desenvolveram MC, com 8,3 % de hemácias infectadas no dia 7 p.i., enquanto nos animais com MNC foi observado uma média de 5,2% e 6,5% de parasitemia entre nos dias 7 e 9 p.i. respectivamente (**Figura. 3 C,D**) .

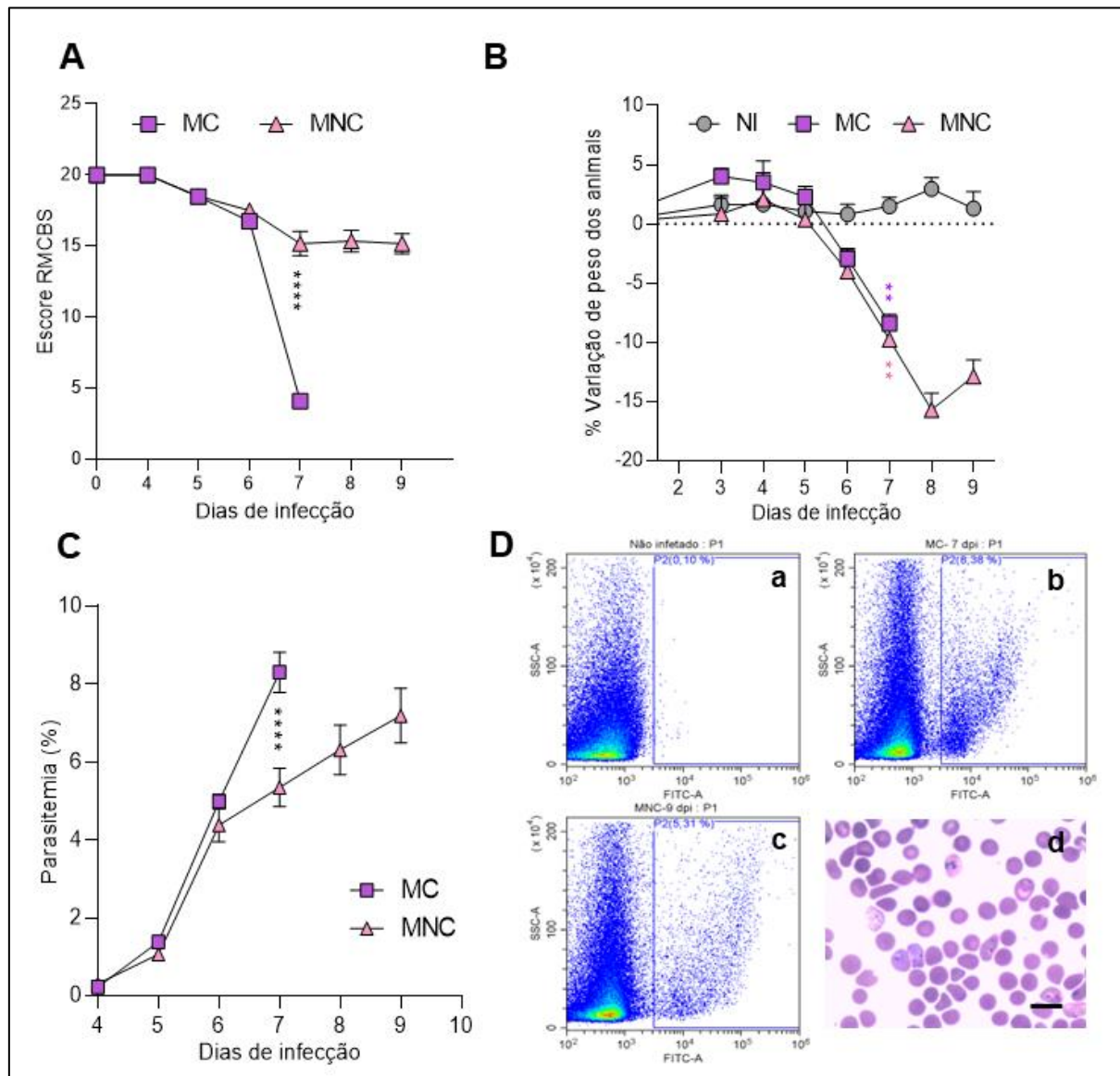


Figura 3. Avaliação do Escore RMCBS, variação do peso e parasitemia durante o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA^{GFP+} via i.v. **(A)** Pontuação RMCBS, peso corporal **(B)**, e porcentagem de parasitemia estimado por citometria de fluxo **(C)**. Figura representativa dos plots da parasitemia feita no citômetro de fluxo **(D)**, grupo de animais não infectados **(D-a)**, grupo CM no dia 7 p.i. **(D-b)**, e grupo MNC no dia 9 p.i. **(D-c)** mostrando a frequência de hemácias infectadas. Representação de esfregaço de sangue periférico de animais infectados aos 7 p.i. **(D-d)**. Escala da barra: 10 μ m. Os dados são apresentados como a média de cada grupo $\pm$ SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados por Two Way ANOVA e pós-teste de Sidak **(A, B, C)**. As diferenças estatísticas em relação ao grupo NI são apontadas de acordo com a cor do símbolo de cada grupo. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Animais com Malária Cerebral (CM) (n=11), animais como Malária Não Cerebral (MNC) (n=4), e camundongos controles não infectados (NI) (n=10).

5.2 Sinais de malária nos animais infectados com *P. berghei* ANKA

Na malária os níveis baixos de hemoglobina, glicose e presença de esplenomegalia são sintomas comuns, devido a isso nós avaliamos a hemoglobina no sangue dos animais no dia da eutanásia. Dessa forma, foi observado que os animais infectados com *P. berghei* ANKA apresentaram níveis de hemoglobina mais baixos, animais com MC ($p < 0,001$) e animais com MNC ($p < 0,0001$) comparados com os animais NI (**Figura. 4A**). Níveis de glicose no soro dos animais também foram mensurados, se observou que diminuição de glicose no soro de animais com MC ($p < 0,01$) e MNC ($p < 0,001$) respeito aos animais NI (**Figura. 4B**). Além disso, o baço dos animais foi avaliado para determinar se os animais apresentavam esplenomegalia. Foi possível observar que nos dois grupos com malária os baços apresentaram aumento de peso quando comparado com o grupo NI ($p < 0,0001$), além disso baços dos animais com MNC apresentaram peso mais elevado que baços dos animais com MC ($p < 0,0001$) (**Figura 4C**). Avaliação da hemoglobina, glicose e peso do baço durante o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA.

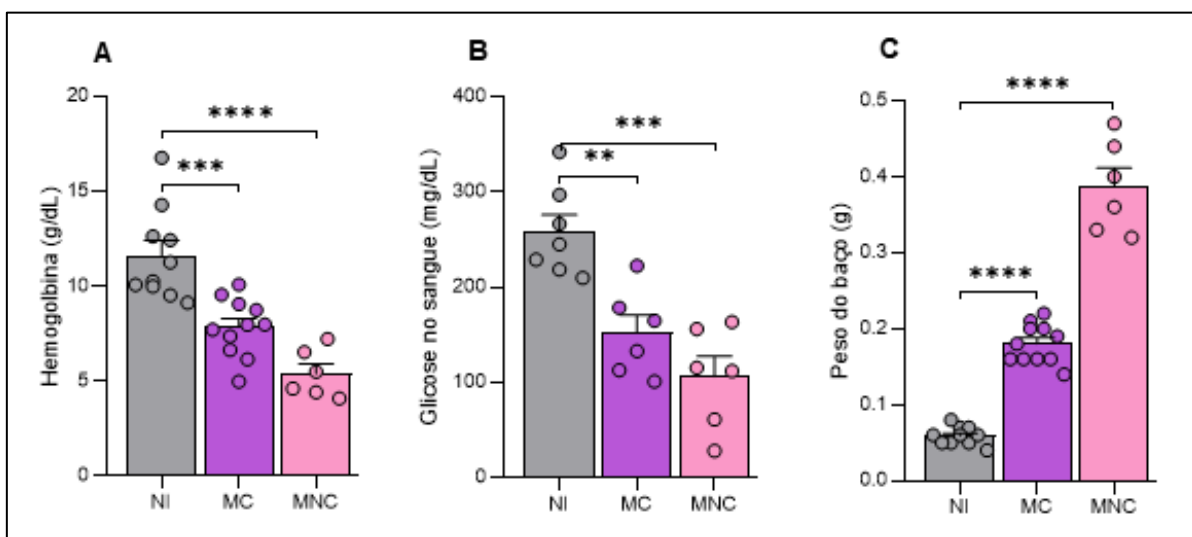


Figura 4. Avaliação da hemoglobina, glicose e peso do baço durante o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* ANKA.

Níveis de hemoglobina, glicose no sangue e peso do baço em camundongos C57BL/6 inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA^{GFP+} i.v. Animais com Malária Cerebral (MC), animais com Malária Não Cerebral (MNC), e camundongos controles não infectados (NI) foram injetados com PBS. **(A)** Hemoglobina no sangue (NI, MC e MNC, $n=6-11$); **(B)** Glicose no sangue (NI, MC e MNC, $n=6-7$); **(C)** Peso do baço (NI, MC e MNC, $n=6-11$). As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i. Os dados são apresentados como a média de cada grupo $\pm$ SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados por Two way ANOVA seguido de testes de comparações post-teste de Sidak **(A, B, C)**. Diferenças estatísticas em relação ao grupo NI. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Adicionalmente observamos os cérebros dos animais, a fim de saber se os mesmos apresentavam alterações histológicas características da doença. Evidenciamos que o grupo com MC apresentou hemorragias cerebrais evidentes no dia 7p.i. (**Figura 5 C,D,E e Figura 6 B,b**), o que não foi observado no grupo com MNC no dia 9 p.i. (**Figura 5 B e Figura 6 C,c**). Além disso, foi detectado acúmulos de sangue com hemácias infectadas nos vasos vasculares dos animais com MC (**Figura. 5F**)

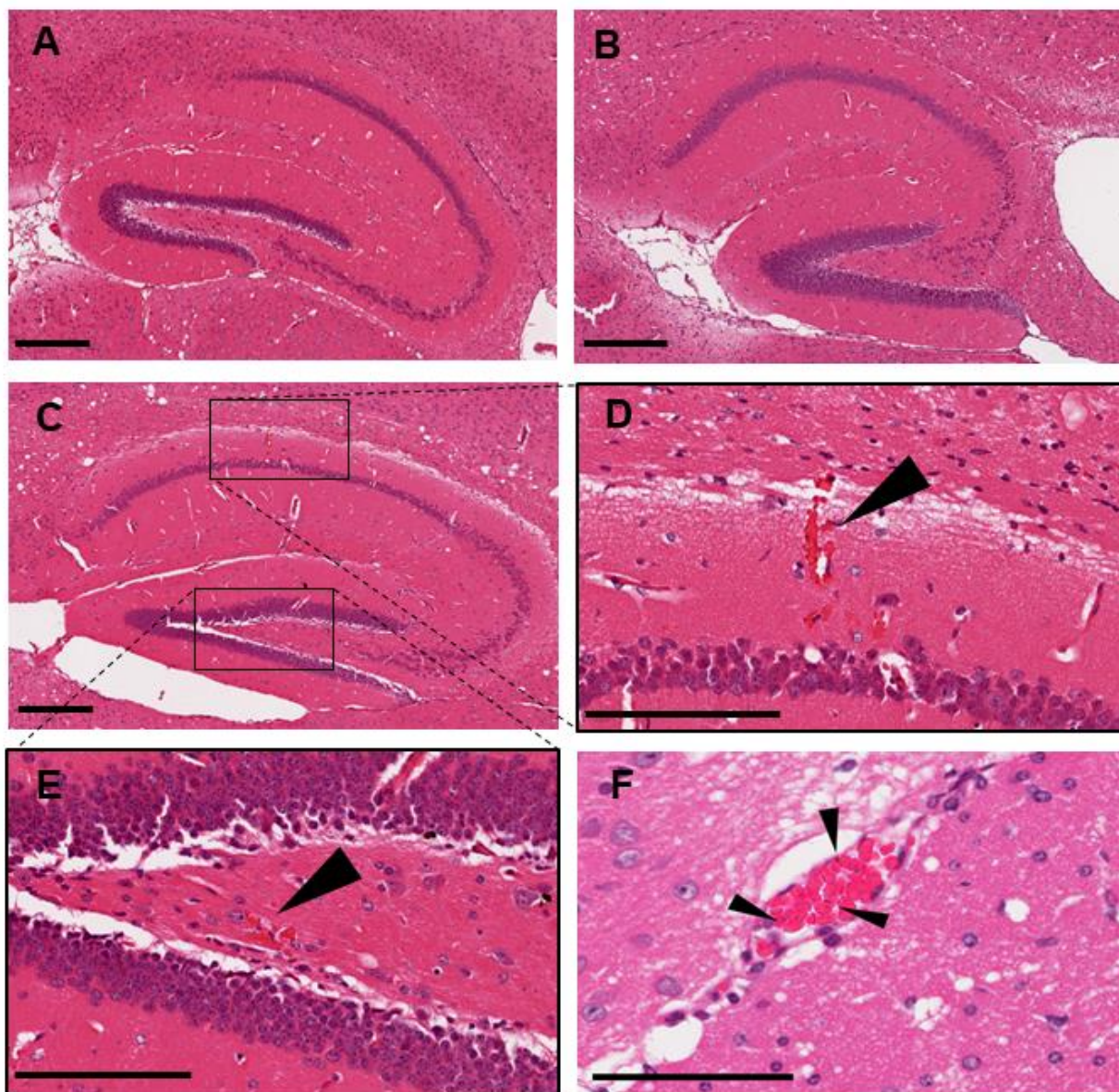


Figura 5. Avaliação histológica de cérebros de camundongos C57BL/6 /infectados com *P. berghei* ANKA.

Fotomicrografias de tecido cerebral na zona do hipocampo de animais infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKAGFP+ por via i.v. Animal controle não infectado (A). Animal com malária cerebral com 7 d.i (C), animal com malária não cerebral com 9 d.i (C). Ampliação de zonas com hemorragia. (D, E) as setas sinalam as hemorragias. Vaso sanguíneo no cérebro

de camundongo com MC que apresenta hemácias infectadas, as setas sinalam as hemácias infectadas (D). Barra de escala: 200µm (A, B, C), 100 µm (D, E) e 60 µm (F).

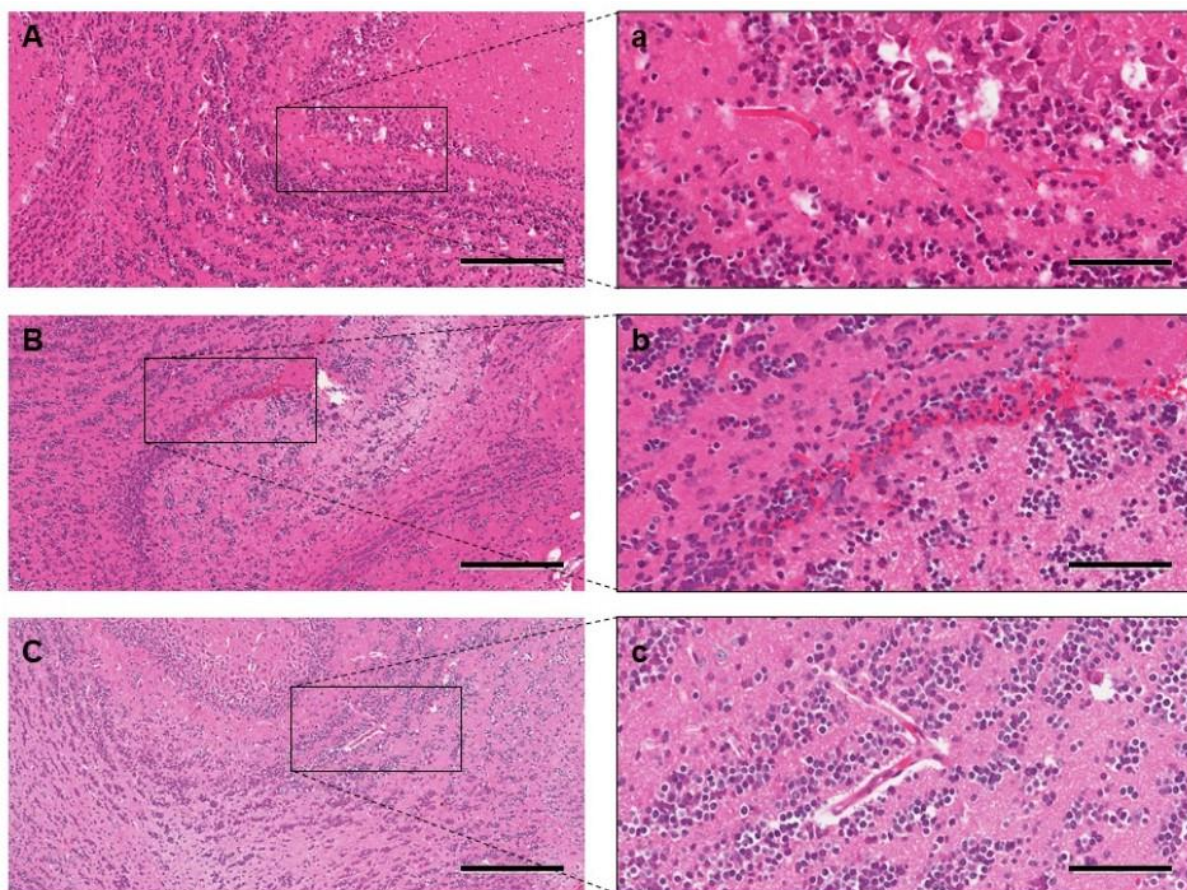


Figura 6. Avaliação histológica de cérebros de camundongos C57BL/6 /infectados com *P. berghei* ANKA.

Fotomicrografia tecido cerebral na zona do bulbo olfatório de animais infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA^{GFP+} por via i.v. Animal controle não infectado (A). Animal com malária cerebral com 7 d.i (B), animal com malária não cerebral com 9 d.i (C). Se pode apreciar hemorragia no cérebro de animal MC (B-b). Barra de escala: 200 µm (A, B, C), 60 µm (a,b,c).

5.3 Análise de retenção gases gástricos e motilidade intestinal durante a malária

Com o objetivo de analisar se durante a infecção ocorrem alterações a nível gastrointestinal, primeiramente foi analisada a retenção de gases gástricos. Foi possível observar que animais infectados com *P. berghei* ANKA apresentaram ausência de gases no estômago, afundando assim que colocados em solução salina tamponada, enquanto o estômago de animais NI flutuaram apresentando gases gástricos (Figura. 7 A-B). Por outro lado, analisamos a motilidade intestinal pelo método do carvão ativado e observamos que os animais com MC apresentaram redução na motilidade intestinal ($p < 0,05$) em comparação com animais não infectados, já os animais com MNC não apresentaram diferença quando comparados com camundongos NI (Figura. 7 C-D).

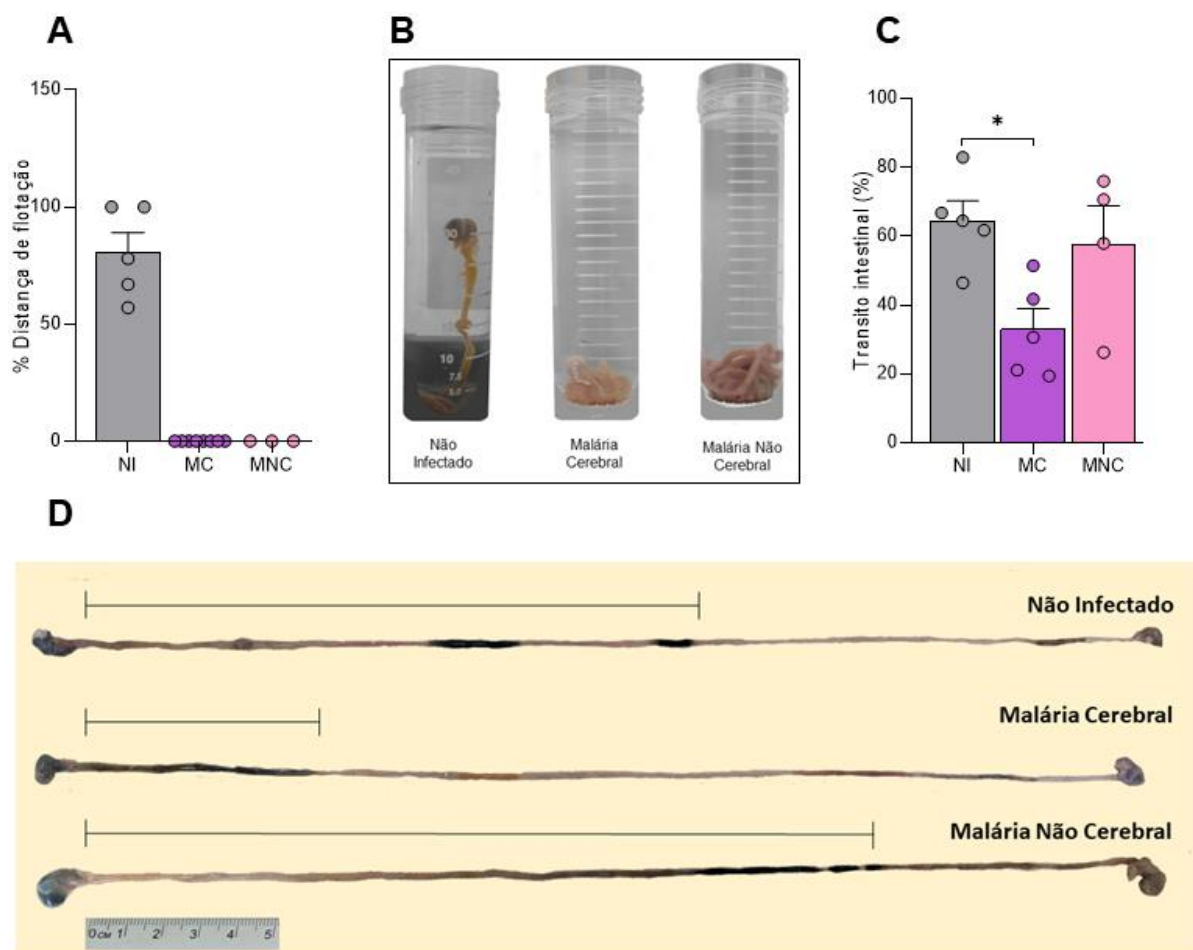


Figura 7. Avaliação de retenção gases gástricos e motilidade intestinal em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA.

Presença de gases gástricos e motilidade intestinal em camundongos C57BL/6 inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ i.v. Animal controle não infectado (NI) (n=5), Animal com malária cerebral (CM) (n=5), animal com malária não cerebral (MNC). **(A)** Gráfico porcentagem de flotação (NI, MC, MNC n=4-8); **(B)** Imagem representativa do teste de flotação; **(C)** Gráfico porcentagem do trânsito intestinal (NI, MC, MNC n= 4-5). Imagem representativa do teste de motilidade intestinal, as linhas sinalizam a distância percorrida pelo carvão ativado **(D)**. As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i e grupo NI. Os resultados representam média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados por One-way ANOVA seguido por testes de comparações post-teste de Sidak **(A-B)**. Diferenças estatísticas em relação ao grupo NI. *p<0,05.

5.4 Alterações no tamanho e peso do intestino durante a infecção com *P. berguei* ANKA

No momento da eutanásia, os intestinos delgado e grosso dos animais foram mensurados para determinar se durante a infecção esses órgãos eram afetados em termos de tamanho e peso. Foi observado macroscopicamente que os animais infectados apresentaram menor quantidade de conteúdo intestinal quando comparado com animais NI, como pode ser observado na **figura 8**, além de alterações na sua coloração a qual pode ser por falta de conteúdo intestinal e aumento de muco.



Figura 8. Imagem representativa dos intestinos de animais C57BL/6 não infectados e infectados com *P. berghei* ANKA apresentando Malária Cerebral e Malária não Cerebral.

A partir da análise do peso intestinal foi possível observar que os camundongos com MC apresentaram intestinos delgados com menores pesos em relação ao grupo NI ($p < 0,01$) e ao grupo MNC ($p < 0,05$) (**Figura 9 A**). Enquanto no intestino grosso houve diferença significativa de peso somente entre o grupo com MC, apresentando menor peso quando comparado ao grupo NI ($p < 0,01$) (**Figura 9B**). Além disso, a mensuração intestinal mostrou que o intestino delgado dos animais com MC foi menor se comparada com os animais NI ($p < 0,05$) (**Figura 9C**), um perfil semelhante foi observado no ceco e intestino grosso de animais com MC, ambos apresentando menor tamanho quando comparados com animais NI ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente) (**Figura 9D e 9E**). Em contrapartida animais com MNC não apresentaram redução significativa quanto ao tamanho do intestino delgado, ceco e intestino grosso.

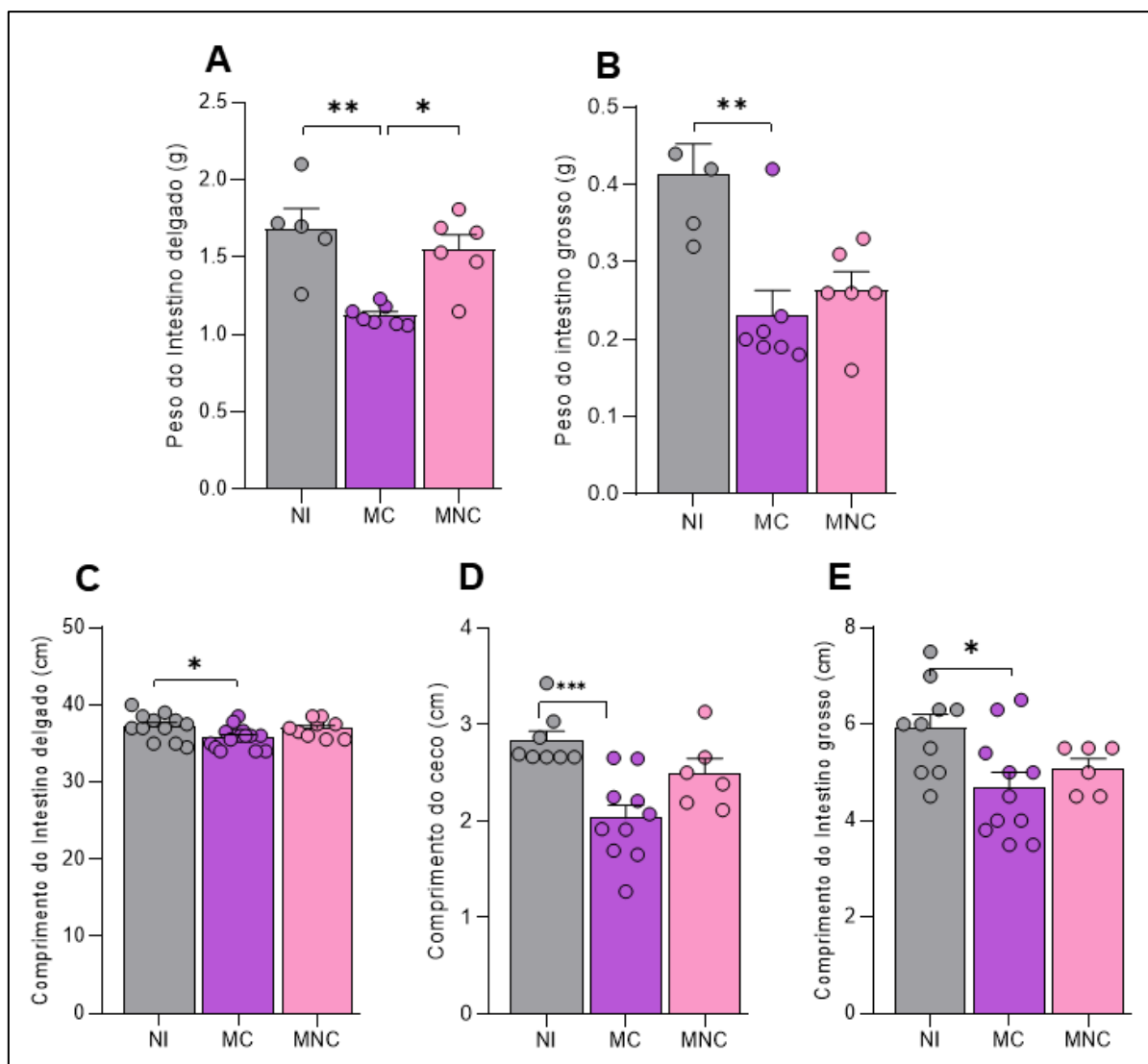


Figura 9. Mensurações de peso e comprimento dos intestinos de camundongos C57BL/6 durante a infecção com *P. berghei* ANKA.

camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ i.v. e os intestinos foram avaliados quanto ao peso e comprimento nos dias 7 (MC) e 9 (MNC) d.i. Animal controle não infectado (NI), Animal com malária cerebral (CM), animal com malária não cerebral (MNC). **(A)** Peso do intestino delgado (NI, MC, MNC n=5-7); **(B)** Peso do intestino grosso (NI, MC, MNC n=4-6); **(C)** Comprimento do intestino delgado (NI, MC, MNC n=9-15); **(D)** Comprimento do ceco (NI, MC, MNC n=6-10); **(E)** comprimento do intestino grosso (NI, MC, MNC n=6-12). Os resultados representam média $\pm$ SEM. Os dados foram analisados por One-way ANOVA seguido por testes de comparações post-teste de Sidak **(A-E)**. Diferenças estatísticas em relação ao grupo PBS. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.5 Análise histológica e detecção de Mastócitos no intestino delgado na infecção por *P. berghei* ANKA

Após analisar macroscopicamente as alterações no intestino delgado durante a malária experimental, o próximo passo foi fazer um estudo histológico para detectar possíveis alterações. Primeiramente foi realizada a coloração H&E para observação da histologia geral do tecido onde não foi observada alterações estruturais dos vilos entre os grupos experimentais NI, MC e MNC (**Figura. 10 A, B, C**).

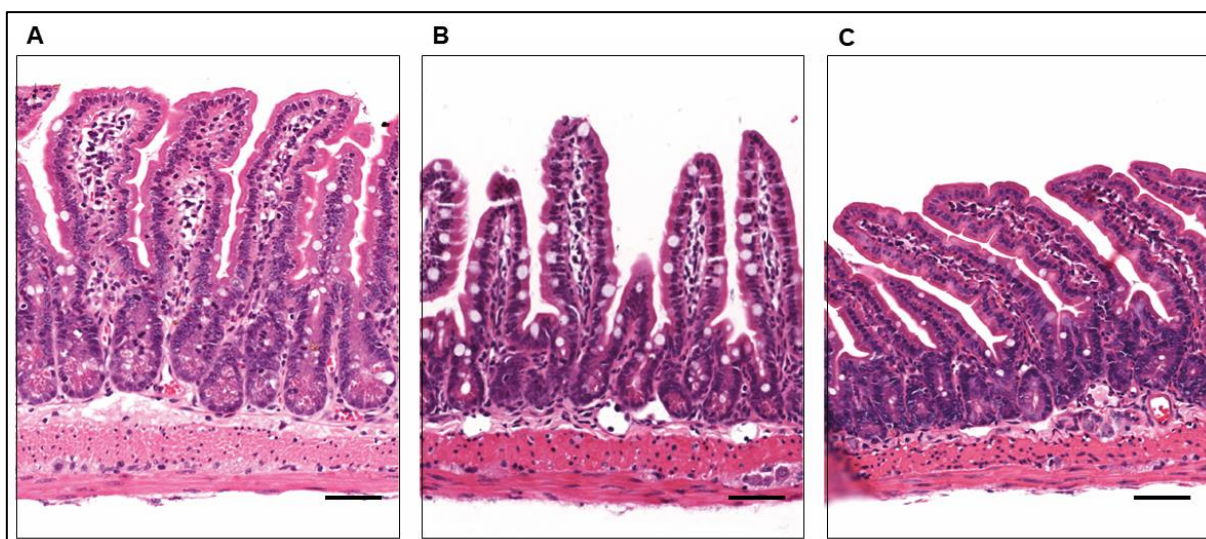


Figura 10. Histologia do intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Fotomicrografia de tecido do jejuno proximal corado por H&E de animais infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ por via i.v. Animal controle não infectado (A). Animais com malária cerebral com 7 d.i. (B), animais com malária não cerebral com 9 d.i. (C). Barra de escala: 50 µm.

Posteriormente foi detectado a presença de mastócitos no intestino delgado (**Figura. 11A**) e realizada a quantificação destas células ao longo de todo o intestino delgado bem como por porção intestinal (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo). Encontramos que os animais com MC apresentaram aumento de mastócitos comparado com os animais NI ($p < 0,01$) e MNC ($p < 0,05$) (**Figura. 11B**). Quando analisados por porção intestinal, foi possível observar que animais do grupo que desenvolveram MC apresentaram maior quantidade de mastócitos no duodeno ($p < 0,5$), nas outras porções intestinais não foi observado diferenças estatísticas (**Figura. 11C**).

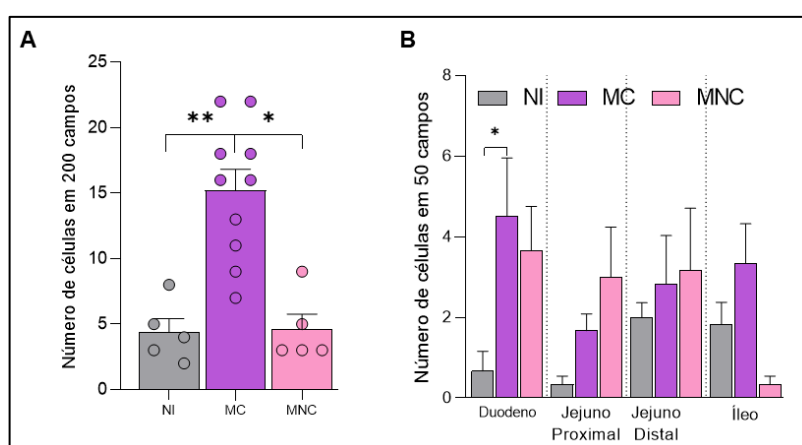


Figura 11. Avaliação de mastócitos no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Animais infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ por via i.v. Animal controle não infectado (NI), Animal com malária cerebral (MC), animal com malária não cerebral (MNC). (A) Mastócitos totais no intestino delgado de animais NI, MC e MNC (NI, MC, MNC n=5-10); (B) Quantificação de mastócitos por porção intestinal (NI, MC, MNC n=5); Os resultados representam média $\pm$ SEM. As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i. Os dados foram analisados por teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças estatísticas em relação ao grupo NI. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.6 Avaliação da camada do muco no intestino grosso e detecção de células caliciformes e avaliação da expressão do gene MUC-2 no intestino delgado de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA

Com a finalidade de observar se havia alteração na camada do muco do intestino grosso, coletamos os intestinos preservando o conteúdo intestinal. Após processamento do material, as secções teciduais foram coradas com Alcian blue e analisadas. Observou-se que a camada de muco está presente nos grupos NI e MNC (**Figura. 12 A, C**), mas não foi possível detectar a mesma no grupo de animais com MC (**Figura. 12B**).

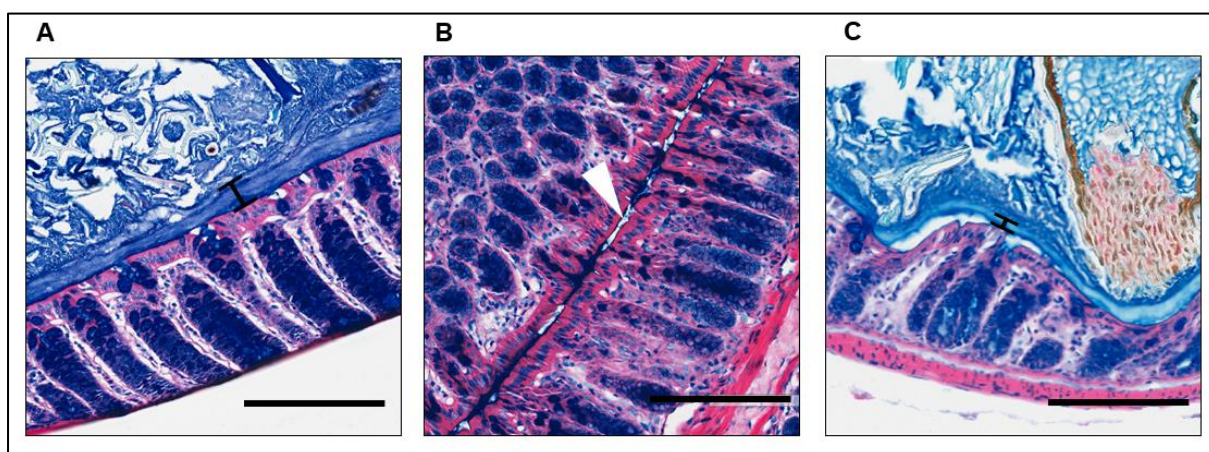


Figura 12. Detecção de camada de muco no intestino grosso de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA.

Fotomicrografia de cólon de animais infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ por via i.v. Animal controle não infectado (**A**). Animais com malária cerebral com 7 d.i. (**B**), animais com malária não cerebral com 9 d.i. (**C**). As linhas pretas mostram a camada do muco (**A, C**), a seta branca mostra a luz do intestino, e a falta de camada do muco (**B**). Barra de escala: 200 µm.

Depois de observar macroscopicamente que o intestino delgado dos animais com MC apresentava aumento de muco, foi realizada a detecção e quantificação de células caliciformes no intestino delgado corados com Alcian Blue (**Figura. 13 A, B, C**). Os resultados revelaram que o intestino delgado de animais com MC apresentou um aumento da quantidade de células caliciformes ao longo do intestino, em relação aos intestinos de animais NI ($p < 0,05$) e com MNC ($p < 0,01$) (**Figura. 13D**). Adicionalmente, a quantificação por porção intestinal mostrou que o aumento de células caliciformes foi significativamente maior na porção do jejuno proximal quando comparado com o grupo NI ($p < 0,05$) e MC ($p < 0,001$), e que o íleo do grupo MC tem maior quantidade de células que o íleo do grupo MNC ($p < 0,0001$) (**Figura. 13E**). Além disso, a mensuração da área das vesículas de secreção apresentou uma relação similar, onde a área das vesículas de secreção do grupo com MC foi maior se comparada com animais NI ($p < 0,05$) e MNC ($p < 0,001$) (**Figura. 13F**). Finalmente, a expressão de MUC-2 foi avaliada no intestino delgado dos animais e foi observado um aumento na expressão do mRNA de

MUC2 nos animais com MC em relação aos animais NI, apesar de não alcançar diferença estatística (**Figura. 13G**).

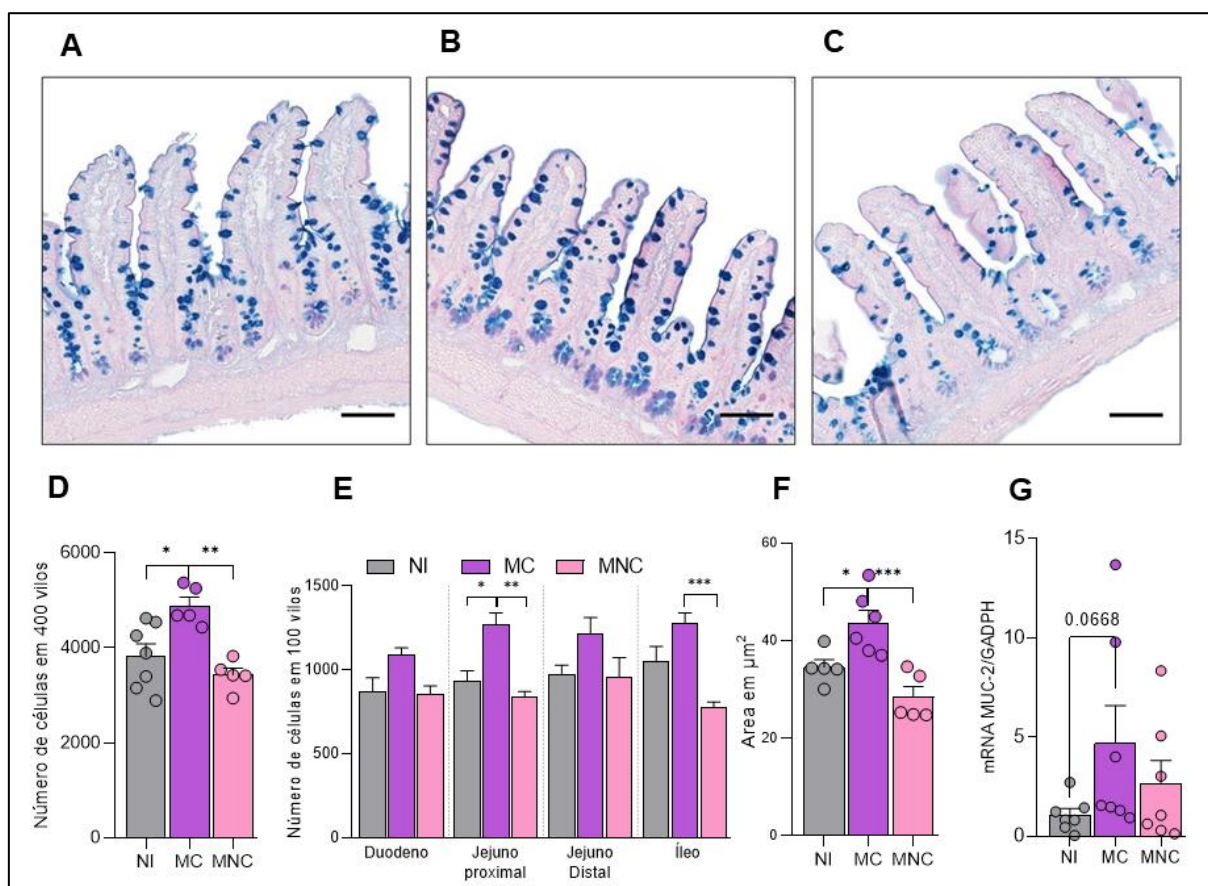


Figura 13. Avaliação de células caliciformes e expressão do gene MUC-2 no intestino delgado de camundongo infectado com *P. berghei* ANKA.

As células caliciformes foram avaliadas por coloração de Alcian Blue (AB) nos intestinos delgados de camundongos C57BL/6 inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ i.v. (A) Animal controle não infectado, NI; (B) Animal com malária cerebral, MC; (C) Animal com malária não cerebral, MNC. Fotomicrografia do íleo com a coloração AB, barra de escala: 50 μ m (A,B,C); (D) Células caliciformes totais no intestino delgado de animais infectados e não infectados (NI, MC, MNC n=5-6); (E) Quantificação de células caliciformes por porção intestinal (NI, MC, MNC n=5-6); (F) Mensuração da área das vesículas de secreção das células caliciformes (NI, MC, MNC n=5-6); (G) Expressão relativa do gene MUC-2. As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i. Os resultados representam a média $\pm$ SEM. Os dados da quantificação das células caliciformes foram analisados por One-way ANOVA seguido por testes de comparações post-teste de Sidak (D-F); A expressão do gene MUC-2 foi analisada por teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (G); Diferenças estatísticas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.7 Detecção de células enterocromafins, e avaliação da expressão dos genes *ChrgA* e *Tph-1* no intestino delgado de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA

No epitélio intestinal estão presentes as células EC as quais são produtoras da serotonina (5-HT), dessa forma nosso próximo passo foi detectar e quantificar as células EC pela coloração de prata no intestino delgado (**Figura. 14A**). Foi observado que a quantidade das células EC foram menores ao longo do intestino dos animais com MC (p<0,001) e MNC (p<0,01) quando comparado com o grupo NI (**Figura. 14B**), no entanto, a quantificação por porção intestinal não apresentou diferença significativa entre grupos nem entre as porções (**Figura. 14C**). Além

da quantificação das células EC, foi analisada a expressão do gene *ChrgA*, que é uma proteína solúvel que compõe maioritariamente os grânulos de secreção das células EC, onde foi observado que o grupo MC apresentou tendência de aumento de expressão de *ChrgA* ($p=0,0570$) (**Figura. 14D**). A expressão do gene *Tph-1* que é a enzima requerida para a síntese de 5-HT também foi avaliada e não foi observado diferença na expressão do mRNA de *THP1* nos animais MC em comparação com os animais NI (**Figura. 14E**).

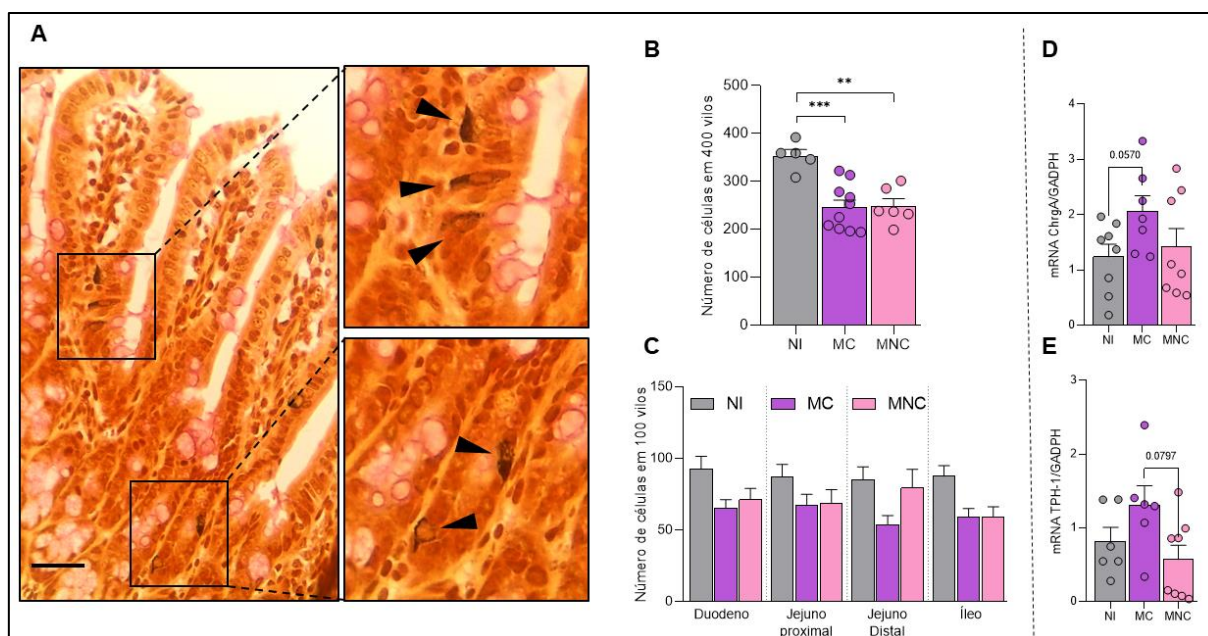


Figura 14. Avaliação de células enterocromafins e expressão mRNA para *ChrgA* e *Tph-1* no intestino delgado de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA.

Avaliação de células enterocromafins (EC) pela coloração pela prata em intestinos delgados de camundongos C57BL/6 inoculados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ por via i.v. Animal controle não infectado (NI), Animais com malária cerebral (MC), animais com malária não cerebral (MNC). **(A)** Imagem representativa da coloração pela prata no tecido intestinal de um animal NI. barra de escala: 50 μ m. **(B)** Células EC totais no intestino delgado dos grupos (NI, MC, MNC $n=5-10$); **(C)** Quantificação de EC por porção intestinal (NI, MC, MNC $n=5-10$); **(D-E)** Expressão relativa do gene *ChrgA* e *Tph-1* (NI, MC, MNC $n=6-8$); Os resultados representam a média $\pm$ SEM. As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i. Os dados da quantificação das EC e a expressão do gene *Tph-1* foram analisados por teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (**B,C,D**); a expressão relativa do gene *ChrgA* foi analisado por One-way ANOVA seguido por testes de comparações post-teste de Sidak. Diferenças estatísticas em relação ao grupo PBS. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

5.8 Detecção de mRNA dos genes *Piezo-2*, *VIP*, *Notch-1* e *Hes-1* no intestino delgado de animais infectados com *P. berghei* ANKA.

Para tentar explicar os fenômenos que acontecem durante a infecção por *P. berghei* ANKA, foi avaliado um conjunto de genes como IL-13, que é secretado pelos linfócitos TH2 e está relacionado com a hiperplasia de células caliciformes (OLIPHANT; BARLOW; MCKENZIE, 2011), *Piezo-2*, que está relacionado com a estimulação mecânica e indução da liberação de 5-HT (WANG et al., 2017), *VIP* que está relacionado com a contração e

relaxamento dos músculos lisos gastrointestinais, com a mediação na resposta anti-inflamatória, homeostasia intestinal, entre outros (IWASAKI; AKIBA; KAUNITZ, 2019); Noch-1 que é a via de sinalização responsável por regular a diferenciação das células secretoras intestinais (NOAH; SHROYER, 2013; XIE et al., 2020) além de regular a expressão de Hes-1 que está envolvido na diferenciação de células absortivas do intestino (enterócitos) (NOAH; SHROYER, 2013). Foi observada uma diminuição significativa na expressão de VIP em animais com MC em relação aos animais NI (**Figura. 15C**). No entanto, não foram observadas diferenças na expressão de piezo2, Notch1 e Hes1 nos animais infectados ou não com *P. berghei* ANKA (**Figura. 15**).

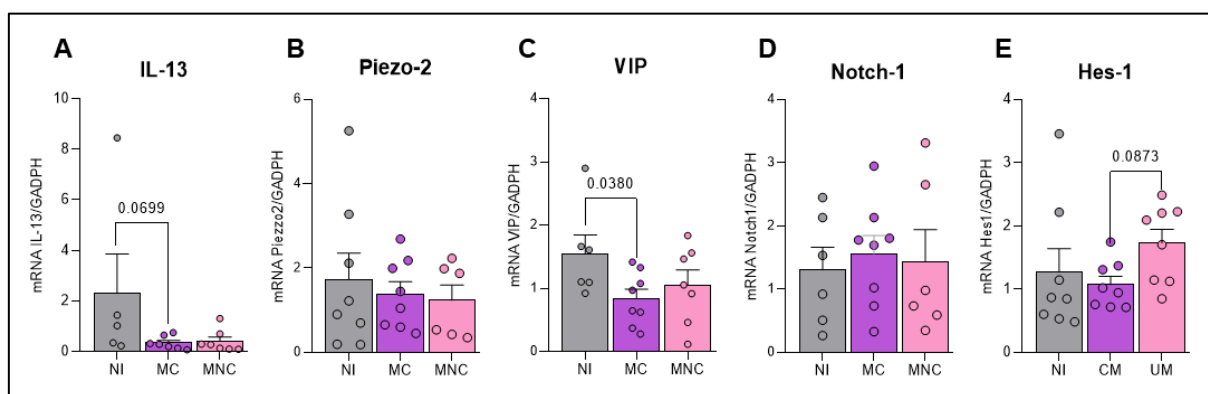


Figura 15. Avaliação da expressão de mRNA dos genes IL-13, Piezo-2, VIP, Notch-1 e Hes-1 no intestino delgado de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA.

Avaliação da expressão de mRNA dos genes Piezo-2, VIP, Notch-1 e Hes-1 em intestinos delgados de camundongos C57BL/6 infectados com 1×10^5 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA GFP+ i.v. Animal controle não infectado (NI), Animal com malária cerebral (CM), animal com malária não cerebral (MNC). Expressão relativa de gene IL-13 (**A**); Expressão relativa de gene Piezo-2 (**B**); Expressão relativa de gene VIP (**C**); Expressão relativa de gene Notch-1 (**D**); Expressão relativa do gene Hes-1 (**E**). As mensurações correspondem para o grupo CM no dia 7 p.i., e grupo MNC no dia 9 p.i. (NI, MC, MNC n=5-8); Os resultados representam a média $\pm$ SEM. Os dados da expressão dos genes Piezo-2, VIP, Notch-1 foram analisados pelo teste de Krustal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (**A,E**); Os dados da expressão do gene Hes-1 foi analisado pelo One-way ANOVA seguido por testes de comparações post-teste de Sidak (**B,C,D**).

6 DISCUSSÃO

A malária cerebral em humanos é a complicação mais grave da infecção por *P. falciparum* (revisado em (LH et al., 2002)). O modelo experimental desta doença, camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, provou ser uma ferramenta eficiente para explicar o comportamento da doença (TANIGUCHI et al., 2015; SHIMADA et al., 2019). Vários estudos têm tentado descrever a doença a partir das diferentes alterações no sistema nervoso central durante a infecção por *Plasmodium*. No entanto, durante o desenvolvimento da doença, o sistema gastrointestinal também é alterado (TANIGUCHI et al., 2015; DENNY et al., 2019; SHIMADA et al., 2019; MOREIRA et al., 2021; MURR et al., 2021), o que representa um efeito colateral da malária cerebral que é pouco estudado e que precisa ser melhor elucidado.

No presente estudo foi possível desenvolver o modelo de malária cerebral no dia 7 p.i. com incidência média de 75,63% dos animais infectados com 1×10^5 hemácias infetadas por via i.v., que é maior do que o apresentado no modelo utilizando camundongos Swiss Webster com inóculos intraperitoneais de 1×10^6 hemácias infectadas (62,7%) (MARTINS et al., 2009). Além disso, nós obtivemos uma parasitemia periférica com média de 8,3% em animais com 7-8 semanas de idade. Em corroboração, estudos anteriores demonstraram que camundongos C57BL/6 com malária cerebral experimental, inoculados com diferentes inóculos e vias de infecção apresentaram parasitemia entre 6 e 11% no dia 7 p.i. (TANIGUCHI et al., 2015; CARIACO et al., 2018; SHIMADA et al., 2019). Por outro lado, os animais sem malária cerebral apresentaram comportamento diferente, com níveis de parasitemia menores em relação aos animais com MC. Embora, nos animais com MNC tenha ocorrido um aumento nos níveis de parasitemia gradualmente ao longo dos dias, no dia 7 p.i. foi observado um valor significativamente menor em relação à parasitemia presente no mesmo dia em animais com MC, atingindo um máximo de 6,2% no dia 9 p.i., valor ainda menor que a parasitemia presente nos animais com MC. Os mais baixos níveis de parasitemia em relação aos animais com MC e a esplenomegalia mais pronunciada no grupo MNC sugerem que nestes animais exista um processo sistêmico diferente que os leva a não desenvolverem MC.

Características típicas da infecção por *Plasmodium*, tais como: baixos níveis de hemoglobina, causados pela fase eritrocitária do parasito onde digerem a hemoglobina como parte de seu metabolismo e desenvolvimento do parasito (FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 2003; RODRÍGUEZ-RAVELO et al., 2013; CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014); diminuição da glicose nos animais devido à demanda adicional gerada pelo parasito (BINH et al., 1997); e presença de esplenomegalia, o que ocorre normalmente na malária devido a estimulação do sistema de monócito-macrófago e a eliminação de eritrócitos

pelo baço, mesmo que não estejam infectados, pois apresentam alterações na membrana causadas pela fragilidade osmótica (GHOSH, 2007), foram evidenciadas em nosso modelo experimental. Adicionalmente, a análise da histologia cerebral dos camundongos, mostrou que os animais com MC apresentavam hemorragias cerebrais e eritrócitos infectados nos vasos sanguíneos, o que corrobora com o diagnóstico de MC.

A avaliação da retenção de gases gástricos mostrou que os animais infectados tanto com MC como MNC não apresentaram nenhum indicio deste processo, enquanto nos animais NI foi observado a presença de gases, situação que é totalmente oposta com o reportado por Shimada e colaboradores (2019), em camundongos C57BL/6 e BALB/c. Embora o modelo experimental seja semelhante (animais C57BL/6 com 7-8 semanas infectados com *P. berghei* ANKA), é importante destacar que os resultados deste teste, pode estar relacionado com fatores como a microbiota intestinal do animal, a qual está associada com o ambiente do mesmo, e pode variar nas condições que encontram, ou seja, o ambiente microbiano dos animais é diferente em cada biotério. Além da carga parasitaria não foi controlada porque a infecção foi feita com mosquito. Nossos animais e aqueles utilizados por Shimada et al., (2019) são animais livres de patógenos específicos, que por definição são “animais mantidos em acomodações que lhes privam de contato com potenciais agentes patogênicos, tornando sua microbiota controlada” (POLITI et al., 2008). Esta definição elucida que os animais apresentam microbiota específica para cada biotério, o que provavelmente pode estar associado com a discordância dos resultados encontrados. Tudo isso pode ser associado ao fato de ter sido demonstrado que a infecção por *Plasmodium* gera alterações na homeostase intestinal alterando a microbiota (TANIGUCHI et al., 2015; MOREIRA et al., 2021). Além disso, a avaliação das características macroscópicas do intestino no momento da eutanásia, mostrou que assim como os resultados obtidos no estudo de Taniguchi e colaboradores (2015) e Shimada e colaboradores (2019), os animais com MC apresentam redução do tamanho e peso do intestino delgado, além do ceco e o intestino grosso.

Por outro lado, foi observado o aumento do muco intestinal no intestino delgado, fenômeno que tem sido relatado para infecções intestinais causadas por vermes e também por alterações na microbiota (PARK et al., 2005; SHIMOKAWA et al., 2017; MOREIRA et al., 2021), devido a camada de muco ter uma função protetora no lúmen intestinal (KIM; KHAN, 2013). Shimada e colaboradores (2019), observaram metaplasia de células caliciformes durante a infecção por *P. berghei* ANKA, mas não quantificaram estas células. As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco, composto principalmente por MUC2 (revisão de (KNOOP; NEWBERRY, 2018). De forma similar, em nosso estudo uma análise quantitativa

foi realizada, demonstrando que existe um aumento não só na quantidade, mas também no tamanho de células caliciformes durante a infecção por *P. berghei* ANKA.

A evidência de hiperplasia em células caliciformes nos levou a avaliar a presença de mastócitos e de IL-13, que tem papel importante na resposta imune intestinal do hospedeiro durante infecções parasitárias (PARK et al., 2005). Além disso, foi sugerida uma relação entre a hiperplasia de células caliciformes e a presença de mastócitos. LAKE e colaboradores (1980) verificaram que a liberação de histamina por mastócitos induz o aumento de muco no duodeno de ratos. No presente trabalho foi evidenciado aumento de mastócitos e células caliciformes em animais com MC no intestino delgado, embora, esta relação não esteja presente na avaliação por porção intestinal. De outro lado, a avaliação de IL-13 não apresentou diferença significativa que permita relacionar sua expressão com a hiperplasia das células caliciformes. A diferenciação das células secretoras no intestino, está regulada pela via Notch, a qual controla o destino das células tronco intestinais regulando a expressão dos genes Hes e reprimindo Atoh1 (NOAH; SHROYER, 2013). Dessa forma, foi analisada a expressão destes genes para verificar se a via Notch de sinalização estava envolvida no aumento do número de células caliciformes em animais com MC, contudo não foram encontradas diferenças na sua expressão, o que pode indicar que o aumento na quantidade de células e secreção das mesmas pode estar relacionada a outros mecanismos.

Indivíduos com malária cerebral causada por *P. falciparum* apresentam baixos níveis de serotonina no sangue, o que pode ser resultado de níveis reduzidos de triptofano, o precursor de 5-HT (ENWONWU et al., 1999; LOPANSRI et al., 2006; BRIGGS et al., 2022). A 5-HT derivada de células EC tem uma ampla gama de ações no intestino, incluindo a modulação da motilidade gastrointestinal (MARTIN et al., 2018a). 95% da serotonina do organismo é encontrada no intestino e produzido por células EC, (revisado de GERSHON; TACK, 2007). Além de ser usada como mensageiro parácrino, ativa neurônios aferentes primários intrínsecos e extrínsecos para iniciar reflexos peristálticos e secretores e transmitir informações ao sistema nervoso central (GERSHON; TACK, 2007). E tem sido associada a diminuição de 5-HT à patologia de doença grave em humanos (ENWONWU et al., 1999; LOPANSRI et al., 2006). As anteriores são razões pelas quais no presente trabalho foram analisadas as células EC. Foi verificado que animais com MC e com MNC apresentaram diminuição de células EC, adicionalmente foi avaliado os níveis de expressão de ChrgA e Tph-1. Tph-1 é o marcador mais específico das células EC, pois é a enzima necessária para a síntese de 5-HT especificamente em células não neuronais (CÔTÉ et al., 2003). Apesar de ser observado uma diminuição de células EC nos animais MC, não foi observado diferença na expressão de Thp1 em relação aos

animais NI. A ChrgA é uma das proteínas mais abundantes localizadas nos grânulos secretores de células enteroendócrinas no trato gastrointestinal (revisão de EISSA et al., 2018). Observamos uma tendência em aumento de ChrgA nos animais MC em relação aos animais NI e ao mesmo tempo uma diminuição de células EC, sugerindo que outras células do sistema enteroendócrino estão envolvidas na expressão de ChrgA em animais com MC.

Embora esperássemos uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de células EC e ChrgA e a expressão de 5-HT e Piezo-2, ou seja, uma diminuição na expressão desses genes para o grupo MC, verificamos que há um aumento de ChrgA nos animais MC e não foi encontrada diferença na expressão de Tph1 nem do Piezo-2 entre os grupos. Esses resultados podem ser explicados se levado em consideração que as CEE apresentam plasticidade e sua atividade hormonal varia durante a migração no epitélio intestinal, além de ser modulada pelo ambiente (BEUMER; GEHART; CLEVERS, 2020). Isso significa que a população celular provavelmente está sendo afetada no momento da diferenciação celular, mas que a população de células presentes está gerando um maior número de grânulos de secreção. No entanto, isso não significa que as células estejam necessariamente gerando serotonina, mas sim que podem estar gerando outro tipo de hormônio, razão pela qual não mostramos alterações na expressão de Tph-1.

A motilidade intestinal, um movimento rítmico das paredes do intestino com contrações e dilatações regularmente alternadas do lúmen (FROELICH et al., 2010), é gerada pela interação especializada de vários elementos integrados como o sistema nervoso entérico. O sistema nervoso entérico é a parte mais complexa do sistema nervoso periférico e, embora tenha a capacidade de gerar respostas coordenadas por conta própria, está intimamente relacionado ao sistema nervoso central, que cria respostas aferentes e eferentes e troca informações entre os dois sistemas (ROMERO T et al., 2012). Além do sistema nervoso, a motilidade também está relacionada ao sistema endócrino por meio de mecanismos de resposta e neurotransmissores envolvidos em ambos (NOZAWA et al., 2009). Verificamos que durante a MC ocorre a perda da motilidade intestinal, pelo qual foi analisada a expressão de Tph-1 e VIP. VIP foi avaliado por exercer efeitos na contração e relaxamento dos músculos por se relacionar com neurônios inibitórios (IWASAKI; AKIBA; KAUNITZ, 2019). A inflamação intestinal tem sido associada a diminuições significativas nos neurônios VIP⁺, bem como a expressão alterada de subpopulações neuronais VIP⁺ (revisão de WU et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que VIP e seu receptor VPAC1 não foram detectados em tecidos de pacientes com Doença intestinal inflamatória que sofrem danos graves na mucosa (revisão de (WU et al., 2015). No presente estudo verificamos que houve uma diminuição de expressão do mRNA de VIP e em paralelo

uma diminuição no trânsito gastrointestinal, sugerindo um envolvimento do peptídeo nessa alteração. Apesar de não verificarmos alterações na expressão de tph1, não mensuramos 5-HT nos tecidos dos animais, portanto, são necessários estudos adicionais para verificar se além da diminuição de VIP, serotonina estaria envolvida na alteração do trânsito intestinal.

O trabalho permitiu determinar que durante a infecção por *P. berghei* ANKA se apresentam algumas alterações no intestino, como mudança no comprimento e peso; hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes, além de aumento de mastócitos e alteração na quantidade de células EC. Estas mudanças podem variar respeito ao desenvolvimento da doença, e dizer se a infecção se desenvolve em malária cerebral ou não.

7 Conclusões

A infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 afeta os intestinos de forma desigual quando os animais desenvolvem ou não malária cerebral.

A malária cerebral gera hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes e por conseguinte aumento de muco intestinal no intestino delgado.

As células enterocromafins estão reduzidas em infecção por *P. berghei* ANKA. No entanto, nenhuma relação foi mostrada com a expressão do mRNA de Tph1.

A expressão de VIP foi diminuída em animais com MC sugerindo que essa diminuição poderia estar envolvida com o desenvolvimento de alterações gastrointestinais observadas nesses animais.

BIBLIOGRAFIA

ABDELLAH, N. et al. Neuropeptide AF Induces Piecemeal Degranulation in Murine Mucosal Mast Cells: A New Mediator in Neuro-Immune Communication in the Intestinal Lamina Propria? **The Anatomical Record**, v. 301, n. 6, p. 1103–1114, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.23780>>.

ADDERLEY, J. et al. Advances in Plasmodium research, an update: Highlights from the Malaria in Melbourne 2021 conference. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 250, n. May, p. 111487, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2022.111487>>.

ADEYEMO, A. O. et al. Malaria vaccine: The lasting solution to malaria burden in Africa. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 79, n. May, p. 104031, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104031>>.

ALLEN, A.; HUTTON, D. A.; PEARSON, J. P. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 797–801, 1 jul. 1998. <doi: 10.1016/s1357-2725(98)00028-4>.

AMANI, V. et al. Cloned lines of Plasmodium berghei ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4093–4099, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108491/#:~:text=In this study%2C we have,ECM in C57BL%2F6 mice.>>>. doi: <10.1128/iai.66.9.4093-4099.1998>

ASIEDU, E. et al. Transcriptomic profiling identifies host-derived biomarker panels for assessing cerebral malaria. **Gene Reports**, v. 28, p. 101650, 1 set. 2022. <<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101650>>

ATUMA, C. et al. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: Thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. 43-5, 2001. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922>>.

BASIR, R. et al. *Plasmodium berghei* ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria. **Experimental Parasitology**, v. 2, n. 3, p. 311–332, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537477/>>.

BEUMER, J.; GEHART, H.; CLEVERS, H. Enteroendocrine Dynamics - New Tools Reveal Hormonal Plasticity in the Gut. **Endocrine reviews**, v. 41, n. 5, 12 jun. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32531023/>>. < doi: 10.1210/endrev/bnaa018>

BINH, T. Q. et al. Glucose metabolism in severe malaria: minimal model analysis of the intravenous glucose tolerance test incorporating a stable glucose label. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 46, n. 12, p. 1435–1440, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9439539/>>. < DOI: 10.1016/s0026-0495(97)90144-x

BIRCHENOUGH, G. M. H. et al. New developments in goblet cell mucus secretion and function. **Mucosal Immunology** 2015 8:4, v. 8, n. 4, p. 712–719, 15 abr. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/mi201532>>. < doi:10.1038/mi.2015.32>

BRIGGS, A. M. et al. Anopheles stephensi Feeding, Flight Behavior, and Infection With Malaria Parasites are Altered by Ingestion of Serotonin. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. June, p. 1–16, 2022. < <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.911097>>

CARIACO, Y. et al. Ethanolic extract of the fungus Trichoderma stromaticum decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. < DOI:10.1038/s41598-018-19840-x>

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. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013124>

CARTER, R. Enzyme variation in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei*. **Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 297–307, 1973. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/enzyme-variation-in-plasmodium-berghei-and-plasmodium-vinckei/FD53E762D1D7378790C6957B2ED7750D>>. < DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182000045236>>

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell. **American Journal of Anatomy**, v. 141, n. 4, p. 461–479, 1 dez. 1974. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aja.1001410403>>.

CHOUGULE, P. et al. Scandinavian Journal of Gastroenterology Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method Isolation and characterization of human primary enterocytes from small intestine using a novel method. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 47, p. 1334–1343, 2012. <doi: 10.3109/00365521.2012.708940>

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>, v. 75, p. 289–311, 11 fev. 2013.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial Hemozoin: From target to tool. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 6, p. 2032, 2014. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.009 >.

CÔTÉ, F. et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13525–13530, 11 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2233056100>>.

DE REZENDE, L. P. et al. Effects of maternal hypothyroidism in the gastrointestinal system of male young offspring from Wistar rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 12, n. 2, p. 286–292, 2021. < DOI: 10.1017/S204017442000029X >

DENNY, J. E. et al. Differential Sensitivity to Plasmodium yoelii Infection in C57BL/6 Mice Impacts Gut-Liver Axis Homeostasis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-40266-6>>.

DIWAKARLA, S. et al. Heterogeneity of enterochromaffin cells within the gastrointestinal tract. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 29, n. 6, p. e13101, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nmo.13101>>. <<https://doi.org/10.1111/nmo.13101>>

DOS SANTOS, L. I. et al. Disrupted Iron Metabolism and Mortality during Co-infection with Malaria and an Intestinal Gram-Negative Extracellular Pathogen. **Cell Reports**, v. 34, n. 2, p. 108613, 12 jan. 2021.

EISSA, N. et al. Chromogranin-A Regulates Macrophage Function and the Apoptotic Pathway in Murine DSS colitis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 2, p. 183–198, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1613-6>>.

ENGWERDA, C. et al. Experimental models of cerebral malaria. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 297, p. 103–143, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16265904/>>.

ENWONWU, C. O. et al. Hyperphenylalaninaemia in children with falciparum malaria. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 92, n. 9, p. 495–503, 1999. Disponível

em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10627868/>>. < DOI: 10.1093/qjmed/92.9.495

FAURE, E. Malarial pathocoenosis: Beneficial and deleterious interactions between malaria and other human diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. Nov, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25484866/>>. < DOI: 10.3389/fphys.2014.00441>

FONG, M.; CRANE, J. S. Histology, Mast Cells. **StatPearls**, 8 maio 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499904/>>.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J.; GOLDBERG, D. E. HEMOGLOBIN METABOLISM IN THE MALARIA PARASITE PLASMODIUM FALCIPARUM. **http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97**, v. 51, p. 97–123, 28 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.51.1.97>>. <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97>>

GERSHON, M. D.; TACK, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 397–414, 1 jan. 2007. < DOI: 10.1053/j.gastro.2006.11.002>

GHAZANFARI, N.; MUELLER, S. N.; HEATH, W. R. Cerebral malaria in mouse and man. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02016>

GHOSH, K.; GHOSH, K. Pathogenesis of anemia in malaria: A concise review. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1463–1469, 16 nov. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-007-0742-1>>. <<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0742-1>>

GOMES, A. P. et al. A infecção pelo gênero Plasmodium: epidemiologia, profilaxia e controle no Brasil. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 47–58, 27 set. 2018. Disponível em: <<https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/7472>>. < DOI: <https://doi.org/10.14295/vittalle.v30i2.7472>>

GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p. 277–299, 2016. < DOI: 10.1146/annurev-fisiol-021115-105439>

GRIFFITH, J. W. et al. Toll-Like Receptor Modulation of Murine Cerebral Malaria Is Dependent on the Genetic Background of the Host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 10, p. 1553–1564, 15 nov. 2007. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/jid/article/196/10/1553/1077262>>.

<<https://doi.org/10.1086/522865>>

GRIMELIUS, L. Silver stains demonstrating neuroendocrine cells. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 79, n. 1, p. 37–44, 2004. <<https://doi.org/10.1080/10520290410001715264>>

GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 27 jul. 2012. <<https://doi.org/10.1016/j.immune.2012.07.003>>

HABER, A. L. et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. **Nature**, v. 551, n. 7680, p. 333, 11 nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature24489>>

HARRISON, A. P. et al. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 3, p. 187–199, 1 maio 2004. <DOI: 10.1016/j.vascn.2004.02.008>

HEARN, J. et al. Immunopathology of cerebral malaria: Morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5364–5376, 2000. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/IAI.68.9.5364-5376.2000>>. <<https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5364-5376.2000>>

HORA, R. et al. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 2, p. 225–237, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-015-9787-5>>.

HOUNNOU, G. et al. Anatomical study of the length of the human intestine. **Surgical and Radiologic Anatomy 2002 24:5**, v. 24, n. 5, p. 290–294, dez. 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00276-002-0057-y>>.

HOWLAND, S. W. et al. Pathogenic CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 221–231, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25772948/>>. < DOI: 10.1007/s00281-015-0476-6>

IWASAKI, M.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system. **F1000Research**, v. 8, 2019. Disponível em: < doi: 10.12688/f1000research.18039.1>.

JOHANSSON, M. E. V. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in

colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 39, p. 15064–15069, 30 set. 2008. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0803124105>>.

KADOWAKI, M.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, S. Neuro-immune crosstalk and food allergy: Focus on enteric neurons and mucosal mast cells. **Allergology International**, v. 71, n. 3, p. 278–287, 1 jul. 2022. < <https://doi.org/10.1016/j.alit.2022.03.004>>

KEVIN BAIRD, J. Evidence and implications of mortality associated with acute plasmodium vivax malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 36–57, jan. 2013. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00074-12>>. <DOI:<https://doi.org/10.1128/CMR.00074-12>>

KIM, J. J.; KHAN, W. I. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55–70, 4 fev. 2013.< DOI: 10.3390/pathogens2010055>

KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunology** 2018 11:6, v. 11, n. 6, p. 1551–1557, 4 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41385-018-0039-y>>. <<https://doi.org/10.1038/s41385-018-0039-y>>

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: A multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 620, 2016. <DOI: 10.3389/fimmu.2015.00620>

KURASHIMA, Y.; KIYONO, H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052424>, v. 35, p. 119–147, 26 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-051116-052424>>. <<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052424>>

LAKE, A. M. et al. Anaphylactic release of intestinal goblet cell mucus. **Immunology**, v. 39, n. 2, p. 173–178, 1980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1457975/pdf/immunology00255-0046.pdf>>

LANDAU, I. Description of *Plasmodium chabaudi*, a Parasite of African Rodents. **Compte Rendu de l'Academie des Sciences**, v. 260, p. 3758–61, 1965.

LANDAU, I.; KILLICK-KENDRICK, R. Rodent plasmodia of the République Centrafricaine:

The sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 633–649, 1966. <DOI: 10.1016/0035-9203(66)90010-1>

LEE, M. S. J.; COBAN, C. **Mucosal vaccine for malaria**. Tokyo, Japan: Elsevier Inc., 2020.

LH, M. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. February, p. 673–679, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/415673a>>. <<https://doi.org/10.1038/415673a>>

LI, C.; MANAGI, S. Global malaria infection risk from climate change. **Environmental Research**, v. 214, p. 114028, 1 nov. 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. <DOI: 10.1006/meth.2001.1262>

LOPANSRI, B. K. et al. Elevated plasma phenylalanine in severe malaria and implications for pathophysiology of neurological complications. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3355–3359, 2006. <doi: 10.1128/IAI.02106-05.>

MARTIN, A. M. et al. Cellular regulation of peripheral serotonin. In: **Serotonin: The Mediator that Spans Evolution**. [s.l.] Academic Press, 2018a. p. 137–153. <DOI: 10.1016/B978-0-12-800050-2.00007-3>

MARTIN, C. R. et al. The Brain-Gut-Microbiome Axis. **Cmgh**, v. 6, n. 2, p. 133–148, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.003>>.

MARTINS, Y. C. et al. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 2, p. 119–130, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19335550/>>. <DOI: doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00622.x.>

MOREIRA, Y. C. et al. Events associated with susceptibility to invasive *Salmonella enterica* serovar Typhi in BALB/c mice previously infected with *Plasmodium berghei* ANKA. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33526848/>>. <doi: 10.1038/s41598-021-82330-0.>

MURR, N. J. et al. *Plasmodium chabaudi* infection alters intestinal morphology and mucosal

innate immunity in moderately malnourished mice. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 1–16, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/13/3/913>>. <<https://doi.org/10.3390/nu13030913>>

NGO-THANH, H. et al. Blood–cerebrospinal fluid barrier: another site disrupted during experimental cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 14, p. 1167–1175, 1 dez. 2020. < OI: 10.1016/j.ijpara.2020.07.007>

NISHANTH, G.; SCHLÜTER, D. Blood–Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 516–528, 1 jul. 2019. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1471492219300868/fulltext>>. <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.010>>

NOAH, T. K.; SHROYER, N. F. Notch in the Intestine: Regulation of Homeostasis and Pathogenesis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183741>, v. 75, p. 263–288, 11 fev. 2013. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-030212-183741>>. <<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183741>>

NOZAWA, K. et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3408–3413, 3 mar. 2009. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0805323106>>. <<https://doi.org/10.1073/pnas.0805323106>>

OCA, M. M. De; ENGWERDA, C.; HAQUE, A. Chapter 23 Mice : A Model of Severe Malaria. v. 1031, p. 203–213, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-481-4_23>. < DOI: 10.1007/978-1-62703-481-4_23>.

OLIPHANT, C. J.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. J. Insights into the initiation of type 2 immune responses. **Immunology**, v. 134, n. 4, p. 378, dez. 2011. <DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03499.x>

OUELLETTE, A. J. Paneth cells and innate mucosal immunity. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 547–553, nov. 2010. Disponível em: <https://journals.lww.com/co-gastroenterology/Fulltext/2010/11000/Paneth_cells_and_innate_mucosal_immunity.3.aspx>. <DOI: 10.1097/MOG.0b013e328333dccde>

PARK, K. et al. Reaction of Mast Cells and Goblet Cells in the Small Intestine of C57BL / 6

and C3H / HeN Mice Infected with *Echinostoma hortense*. v. 11, p. 259–266, 2005. Disponível em: <<https://koreascience.kr/article/JAKO200507523293923.page>>.

PATTARADILOKRAT, S. et al. The origins, isolation, and biological characterization of rodent malaria parasites. **Parasitology International**, v. 91, n. July, p. 102636, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102636>>.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 3 ago. 2017a.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers** 2017 3:1, v. 3, n. 1, p. 1–24, 3 ago. 2017b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp201750>>. <<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>>

POLITI, F. A. S. et al. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 17–28, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/489>>.

PORTER, E. M. et al. The multifaceted Paneth cell. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 2002 59:1, v. 59, n. 1, p. 156–170, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-002-8412-z>>. <<https://doi.org/10.1007/s00018-002-8412-z>>

REAL, E.; MANCIO-SILVA, L. Single-cell views of the Plasmodium life cycle. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 9, p. 748–757, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.05.009>>.

REST, J. R. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 410–415, 1982a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7051459/>>. < DOI: 10.1016/0035-9203(82)90203-6>

REST, J. R. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 410–415, 1982b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7051459/>>. < DOI: 10.1016/0035-9203(82)90203-6>.

REZZANI, R. et al. A Focus on Enterochromaffin Cells among the Enteroendocrine Cells: Localization, Morphology, and Role. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 3758, v. 23, n. 7, p. 3758, 29 mar. 2022. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3758/htm>>.

<

<https://doi.org/10.3390/ijms23073758>>.

RODHAIN, J. [*Plasmodium vinckei* n. sp.; second plasmodium parasite of wild rodents at Katange]. **undefined**, 1952. <<http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153211>>

RODRÍGUEZ-RAVELO, R. et al. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 13, 2013. Disponível em: <<http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/1678-9199-19-13>>.

ROMERO T, J. O. et al. Artículo de revisión Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. **Acta Pediatr Mex**, v. 33, n. 4, p. 207–214, 2012. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/actpedmex/apm-2012/apm124h.pdf>>.

SATO, T.; CLEVERS, H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. **Science**, v. 340, n. 6137, p. 1190–1194, 7 jun. 2013. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1234852>>. <DOI: 10.1126/ciencia.1234852>

SHIMADA, M. et al. Upper gastrointestinal pathophysiology due to mouse malaria *Plasmodium berghei* ANKA infection. **Tropical Medicine and Health**, v. 47, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-019-0146-9>>.

SHIMOKAWA, C. et al. Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. **Immunity**, v. 46, n. 5, p. 863– 874.e4, 16 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28514691/>>. < DOI: 10.1016/j.immune.2017.04.017>.

SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 7–8, p. 997–1004, 1 jun. 2005. <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003>>

STAPPENBECK, T. S. Paneth Cell Development, Differentiation, and Function: New Molecular Cues. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 30–33, 1 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508509007781/fulltext>>. < DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.013>>

TAKAHASHI, N. et al. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1755–1761, 4 ago. 2008. < doi: 10.1084/jem.20080588>

TANIGUCHI, T. et al. Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15699>.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-018-9752-9>.

TREUTING, P. M.; VALASEK, M. A.; DINTZIS, S. M. Upper Gastrointestinal Tract. **Comparative Anatomy and Histology**, p. 155–175, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00011>

TYTGAT, K. M. A. J. et al. Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. **Gastroenterology**, v. 107, n. 5, p. 1352–1363, 1 nov. 1994. <DOI: 10.1016/0016-5085(94)90537-1>

UDDIN, S. J. et al. Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of Xylocarpus moluccensis in castor oil- and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 139–143, 3 out. 2005. <DOI: 10.1016/j.jep.2005.04.006>

VARNDELL, I. M. et al. Ultrastructural localization of chromogranin: a potential marker for the electron microscopical recognition of endocrine cell secretory granules. **The Histochemical Journal** 1985 17:9, v. 17, n. 9, p. 981–992, set. 1985. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01417947>.

VINCKE, I.; DE, M. L.-A. de la S. belge; 1948, undefined. A new plasmodium from a wild Congo rodent Plasmodium berghei n. sp. **pubmed.ncbi.nlm.nih.gov**, [s.d.]Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18874862/>.

WANG, F. et al. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 1, p. 79–91, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27392819/>. <DOI: 10.1113/JP272718>

WELLS, J. M.; SPENCE, J. R. How to make an intestine. **Development**, v. 141, n. 4, p. 752–

760, 15 fev. 2014. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/dev/article/141/4/752/46597/How-to-make-an-intestine>>. <<https://doi.org/10.1242/dev.097386>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>>.

WU, X. et al. Vasoactive Intestinal Polypeptide Promotes Intestinal Barrier Homeostasis and Protection Against Colitis in Mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125225, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125225>>. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125225>>

XIE, S. et al. Cadmium ingestion exacerbates Salmonella infection, with a loss of goblet cells through activation of Notch signaling pathways by ROS in the intestine. **Journal of Hazardous Materials**, v. 391, p. 122262, 5 jun. 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122262>>

XU, X. et al. Enterochromaffin Cells: Sentinels to Gut Microbiota in Hyperalgesia? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1014, 14 out. 2021. <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.760076>>

YANÉZ, D. M. et al. $\gamma\delta$ T-Cell Function in Pathogenesis of Cerebral Malaria in Mice Infected with Plasmodium bergheiANKA. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 446–448, 1999. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.67.1.446-448.1999>>.

YUNTA, E. R. ETHICS OF RESEARCH WITH ANIMAL MODELS FOR HUMAN DISEASES ÉTICA DA PESQUISA EM MODELOS ANIMAIS DE ENFERMIDADES HUMANAS. **Acta Bioethica**, v. 13, n. 1, 2007. <<http://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>>

8 Anexos

Anexo 1.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Papel da infecção por Plasmodium berghei ANKA em alterações intestinais de camundongos C57BL/6”**, protocolo nº **050/21**, sob a responsabilidade de **Neide Maria da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **25 de fevereiro de 2022**.

(We certify that the project entitled **“Papel da infecção por Plasmodium berghei ANKA em alterações intestinais de camundongos C57BL/6”** protocol **050/21**, under the responsibility of **Neide Maria da Silva** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **February 25th, 2022**).

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 09/03/2022 Término: 30/11/2025
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL/6
Número de animais	225
Peso / Idade	22g/ 08 – 12 semanas
Sexo	Fêmea
Origem / Local	REBIR – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Uberlândia, 07 de março de 2022.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R.Nº 1114/2020