



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**VIVIANE FREIBERGER**

**PARÂMETROS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À MALÁRIA CEREBRAL NO PERÍODO INFANTO**

Palhoça

2018

**VIVIANE FREIBERGER**

**PARÂMETROS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS  
ADULTOS SUBMETIDOS À MALÁRIA CEREBRAL NO PERÍODO INFANTO**

**NEUROCIÊNCIAS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Clarissa Martinelli Comim, Dra.

Palhoça

2018

F93 Freiberger, Viviane, 1994-  
Parâmetros relacionados à depressão em camundongos adultos submetidos à malária cerebral no período infante / Viviane Freiberger. – 2018.  
65 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.  
Orientação: Prof. Clarissa Martinelli Comim

1. Malária. 2 Sistema nervoso central. 3. Depressão mental. I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.9362



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO**

Título da Dissertação

Parâmetros relacionados à depressão em camundongos adultos submetidos à malária cerebral no período infante

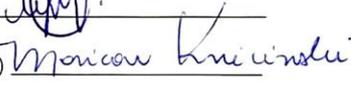
**VIVIANE FREIBERGER**

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 20 de novembro de 2018.

Doutora Clarissa Martinelli Comim (orientador) \_\_\_\_\_ 

Doutora Lutiana Roque Simões (Avaliador externo - UNESC) \_\_\_\_\_ 

Doutor Maicon Roberto Kwiecinski (avaliador interno - PPGCS) \_\_\_\_\_ 



*Professor Doutor Jefferson Traibert*

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

## **AGRADECIMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 “This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## RESUMO

**Introdução:** A malária cerebral (MC) está entre as principais causas de mortalidade associada à malária. Há relatos de que sobreviventes a MC podem desenvolver déficits neurocognitivos de longo prazo. Estudos têm evidenciado o papel da neuroinflamação no desenvolvimento da depressão. A neuroinflamação pode modular significativamente o desenvolvimento encefálico, a regulação imune e endócrina, bem como os circuitos neurais, resultando em mudanças fisiológicas e comportamentais. **Objetivo:** Avaliar parâmetros relacionados à depressão em camundongos adultos submetidos à malária cerebral no período infante. **Métodos:** Animais C57BL/6 com 21 dias de vida foram infectados com *Plasmodium Berghei* ANKA. Após seis dias da infecção, estes animais foram tratados com cloroquina durante sete dias e aos 46 dias de vida, receberam PBS ou Imipramina durante 14 dias. Ao completarem 60 dias de vida, foram avaliados o consumo de sacarose; o tempo de imobilidade; o peso ponderal, volume da glândula adrenal e do hipocampo; os níveis plasmáticos de corticoesterona e hipocampus de BDNF e IL-1 $\beta$ . **Resultados:** Pode-se observar que os animais expostos a MC no período infante e avaliados na vida adulta apresentaram um aumento do tempo de imobilidade; um aumento do volume da glândula adrenal, um aumento dos níveis plasmáticos de corticoesterona, uma redução do volume do hipocampo; uma diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e um aumento dos níveis de IL-1 no hipocampo. Dentre os parâmetros avaliados, somente os níveis de IL-1 $\beta$  não foram revertidos com o uso do antidepressivo. O peso ponderal dos animais e o teste de preferência por sacarose também foram avaliados, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre os grupos. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que a ativação imune no período infante pode estar associada a parâmetros relacionados à depressão na vida adulta.

**Palavras-chave:** Malária Cerebral; Neurodesenvolvimento; Depressão.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cerebral malaria (CM) is among the main causes of mortality associated with malaria. There are reports that MC survivors may develop long-term neurocognitive deficits. Studies have shown the role of neuroinflammation in the development of depression. Neuroinflammation can significantly modulate encephalic development, immune and endocrine regulation, as well as neural circuits, resulting in physiological and behavioral changes. **Objective:** To evaluate parameters related to depression in adult mice submitted to cerebral malaria in the infantile period. **Methods:** C57BL/6 animals at 21 days of age were infected with Plasmodium Berghei ANKA. After six days of infection, these animals were treated with chloroquine for seven days and at 46 days of life received PBS or Imipramine for 14 days. At 60 days of life, the consumption of sucrose was evaluated; the time of immobility; weight, volume of the adrenal gland and hippocampus; the corticoesterone and hippocampal plasma levels of BDNF and IL-1 $\beta$ . **Results:** It can be observed that the animals exposed to MC in the infantile period and evaluated in the adult life showed an increase of the immobility time; an increase in adrenal gland volume, an increase in plasma corticosteroid levels, a reduction in hippocampal volume; a decrease in BDNF levels in the hippocampus and an increase in levels of IL-1 in the hippocampus. Among the parameters evaluated, only IL-1 $\beta$  levels were not reversed with antidepressant use. The weight of the animals and the sucrose preference test were also evaluated, however, they did not present a significant difference between the groups. **Conclusion:** These results suggest that immune activation in the infantile period may be associated with parameters related to depression in adult life.

**Key-words:** Cerebral Malaria; Neurodevelopment; Depression.

## LISTA

### Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância de uma via
BDNF	Fator de Neurotórico derivado do cérebro, do inglês <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> .
BHE	Barreira Hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal.
IL	Interleucina
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase.
LANEX	Laboratório de Neurociência Experimental
MC	Malária Cerebral
MIA	Morte indolor assistida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA – Grupo Experimental
RBC	Hemácias Não-parasitadas – Grupo Controle
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNISUL	Universidade do Sul de Santa Catarina
WHO	World Health Organization

## Lista de Quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo	33
Quadro 2 – Resultados do estudo	49

## Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de transmissão da malária	13
Figura 2	Hipótese: desafio imune na fisiopatologia da depressão	21
Figura 3	Etapas do experiment	30
Figura 4	Determinação da melhor concentração de sacarose	34
Figura 5	Avaliação da preferência por sacarose	35
Figura 6	Avaliação da imobilidade	35
Figura 7	Avaliação do peso ponderal	36
Figura 8	Avaliação do peso da glândula adrenal	37
Figura 9	Avaliação dos níveis plasmáticos de corticoesterona	37
Figura 10	Avaliação do peso do hipocampo	38
Figura 11	Avaliação dos níveis de BDNF em tecido hippocampal	39
Figura 12	Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ em tecido hippocampal	39

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
<b>1.1.1 Malária.....</b>	<b>11</b>
1.1.1.1 Malária Cerebral.....	15
<b>1.1.2 Transtorno Depressivo Maior.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.3 Modelo Animal de Malária Cerebral.....</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	27
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	27
3.3 ANIMAIS.....	27
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	28
<b>3.4.1 Infecção.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2 Delineamento do experimento.....</b>	<b>29</b>
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS.....	31
<b>3.5.1 Avaliação do peso ponderal.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.2 Preferência por solução de sacarose.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.3 Teste de suspensão pela cauda.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.4 Avaliação do peso do hipocampo e da glândula adrenal.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.5 Avaliação dos níveis de corticoesterona .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.6 Avaliação do níveis de BDNF e IL-1<math>\beta</math> em tecido hipocampal.....</b>	<b>32</b>
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	33
3.7 ANÁLISE DE DADOS.....	33
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.....	34
4.2 AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE.....	34
4.3 AVALIAÇÃO DA IMOBILIDADE.....	35
4.4 AVALIAÇÃO DO PESO PONDERAL.....	36
4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL.....	36

4.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOESTERONA.....	37
4.7 AVALIAÇÃO DO PESO DO HIPOCAMPO.....	38
4.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDO HIPOCAMPAL.....	38
4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1 $\beta$ EM TECIDO HIPOCAMPAL.....	39
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A – Parecer Aprovação do Comitê de Ética.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças infecciosas que mais contribui para a carga global de doenças, afetando mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo<sup>1</sup>. As infecções por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* representam a maioria dos casos de malária. A transmissão ocorre pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*, em aproximadamente 97 países, que estão localizados em regiões tropicais, como África Subsaariana, Sudeste Asiático e América do Sul<sup>2</sup>.

Em áreas de alta transmissão, o risco de malária é maior entre crianças menores de 5 anos. Em outras áreas, com risco de transmissão leve a moderado, a malária acomete todas as faixas etárias, apesar de apresentar maior risco para as gestantes, indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)/síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e em pessoas submetidas a esplenectomia<sup>3</sup>.

A malária cerebral (MC) está entre as principais causas de mortalidade associada à malária. A condição é uma complicação da infecção por *Plasmodium falciparum*, caracterizada por encefalopatia complexa e potencialmente reversível que leva ao coma e ocorre com ou sem sinais de comprometimento em outros órgãos. No entanto, apesar da terapia antipalúdica ser eficaz, os indivíduos que sobrevivem a MC podem desenvolver déficits neurocognitivos de longo prazo, sugerindo que a eliminação do parasita não resolve completamente as consequências clínicas da infecção<sup>4</sup>.

Os processos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da MC incluem a ativação de células endoteliais, perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e um desequilíbrio das respostas pró e anti-inflamatórias ao *Plasmodium*; porém, a sequência de eventos e a contribuição para desenvolvimento da MC continuam desconhecida<sup>5</sup>.

Um estudo publicado por Mc Donald e colaboradores (2015) demonstrou uma ligação causal entre a exposição pré-natal à malária e subsequente comprometimento neurocognitivo na prole, os resultados indicam à infecção materna por malária pode alterar o desenvolvimento cognitivo e neurológico da prole, visto

que a prole apresentou comprometimento da aprendizagem e da memória e comportamento semelhante à depressão que persistiram até a idade adulta<sup>6</sup>.

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos que mais contribui para a carga global de doenças, afetando mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. As características do transtorno incluem a persistência de um ou mais episódios de tristeza ou anedonia durante um período de duas semanas, com manifestação de sintomas cognitivos e somáticos, como mudanças no apetite e peso, padrões de sono, nível de energia, concentração, ou atividade física, sentimentos de inutilidade e culpa, e pensamentos ou comportamentos suicidas<sup>7</sup>.

O processo fisiopatológico da depressão tem sido alvo de muitas pesquisas, isto porque a condição ainda é pouca compreendida e apresenta várias hipóteses devido a sua heterogeneidade no curso da doença<sup>8</sup>. Há relatos de que interferências no processo de neurodesenvolvimento, como um insulto inflamatório sistêmico durante o período fetal, infância ou início da adolescência pode ser um mecanismo subjacente à alta comorbidade de certos transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão e a esquizofrenia<sup>9,10</sup>. Em paralelo, na literatura já está bem estabelecido que as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a ativação do sistema imune inato, têm a capacidade de influenciar as funções cerebrais e induzir o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a depressão<sup>11</sup>.

As doenças parasitárias afetam grande parcela da população mundial, provocando mortes e impactando negativamente a qualidade de vida e o desenvolvimento dos países<sup>12</sup>. Na literatura encontram-se muitos estudos esclarecendo a fase aguda da MC infantil e o cenário neuroinflamatório, contudo, a discussão de aspectos a longo prazo ainda é muito recente e questionável. Estudos epidemiológicos mostraram que a neuroinflamação no início da vida predispõe ao desenvolvimento de problemas de saúde mental na idade adulta<sup>13,14,15</sup>. O aumento da prevalência de depressão e estudos indicando uma possível relação da doença com um quadro inflamatório na infância desperta o interesse de investigar a associação da MC infantil e a depressão. Neste sentido, formulou-se o seguinte questionamento: Camundongos submetidos à MC no período infante podem apresentar parâmetros relacionados à depressão durante a fase adulta? O presente estudo pretende fundamentar a relação da MC na infância e os parâmetros

relacionados à depressão, visto que apesar das evidências entre doenças infecciosas e transtornos psiquiátricos, até o momento não foi encontrada evidências sólidas sobre esta relação em estudos clínicos ou pré-clínicos. O resultado deste estudo servirá como um ponto de partida para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos desta relação e também de possíveis intervenções terapêuticas, visto que se confirmada, se faz necessário chamar atenção de organizações públicas para com as vítimas da MC, para que possam ser acompanhadas após a alta hospitalar e ser amenizado os efeitos ou até prevenir essa possível associação, de processo infeccioso no início da vida e o desencadeamento de transtornos psiquiátricos na vida adulta.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Malária

A malária é uma parasitose transmitida pela picada das fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, causada por protozoários intracelulares de cinco espécies: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* (responsável pela forma mais grave da doença), *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*<sup>16</sup>. A transmissão da doença ocorre em grandes áreas da África, América Central e América do Sul, e as principais vítimas são mulheres grávidas e crianças menores de cinco anos<sup>2</sup>. No Brasil, três são as espécies causadoras de malária: *Plasmodium vivax*, *falciparum* e *malariae*. Nos últimos 15 anos, uma média de aproximadamente 420 mil casos de malária foram registrados anualmente no Brasil, grande parte destes, em torno de 99,7%, concentrada na região Amazônica<sup>17</sup>. Em 2015, houve 212 milhões de casos e 429 mil mortes por malária em todo o mundo<sup>2</sup>.

Atualmente a malária é um dos principais problemas de saúde pública do mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que cerca de 40% da população mundial viva em áreas de risco, sendo crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas os grupos mais afetados<sup>18</sup>. A malária não só é mais comum nos países pobres, como também é uma causa da pobreza e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico. A maior parte dos países da África, por exemplo, não têm condições financeiras de prevenir ou tratar a doença. Os gastos

com a malária nesta região são estimados em 12 bilhões de dólares a cada ano, o impacto econômico envolve custos com saúde, dias de trabalho perdidos pela doença, dias perdidos em educação, produtividade prejudicada devido a danos cerebrais e diminuição de investimento em turismo<sup>12</sup>. Sabe-se que houve um declínio de 18% e 48% dos casos de malária globais e mortes, respectivamente, entre 2000 e 2015. E este sucesso foi devido à prevenção, feita contra as picadas do mosquito, por meio de distribuição de redes de proteção (especialmente sobre as camas, uma vez que o mosquito tem hábitos noturnos), repelentes de insetos, inseticidas e eliminação de depósitos de água parada<sup>19</sup>.

Estirpes de *Plasmodium* resistentes a múltiplos fármacos provaram ser um problema desafiador no controle da malária na maior parte do mundo<sup>20</sup>. A visão da Organização Mundial da Saúde (OMS) é um mundo livre de malária. Como parte desta visão, existem objetivos globais ambiciosos para 2030 com marcos para medir o progresso em 2020 e 2025. A prioridade para todos os países em que as taxas de transmissão de malária são altas ou moderadas é garantir a redução máxima da morbidade e da mortalidade por meio da previsão contínua de acesso universal a medidas de controle de vetores adequadas, diagnósticos e medicamentos antimaláricos, juntamente com a implementação de todas as terapias preventivas recomendadas pela OMS que são apropriadas para esse cenário epidemiológico<sup>18</sup>.

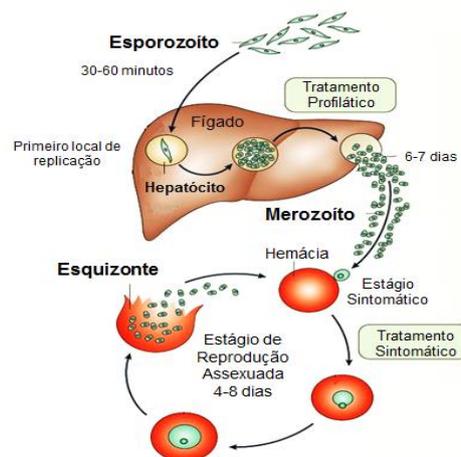
Fisiopatologicamente, quatro componentes compreendem o sistema da malária: o vetor, o parasita, o humano e o meio ambiente. No entanto, muitos fatores afetam cada uma das quatro peças do sistema, adicionando complexidade ao entendimento e controle da doença. O vetor é moldado pelo tipo de espécies de *Anopheles*, alimentação associada, repouso, picada, comportamento de reprodução, faixa de vôo, capacidade vetorial, taxa de mortalidade, reprodução, resistência do mosquito contra inseticidas e resistência larval a larvicidas<sup>21</sup>. As questões importantes relativas ao parasita incluem o tipo e a tensão, a resistência aos medicamentos antimaláricos e a duração da infecção. O componente humano é moldado por vários fatores, incluindo imunidade genética e adquirida, comportamento, demografia, cultura, características socioeconômicas e políticas. Por último, o componente ambiental depende da temperatura, umidade, precipitação, qualidade do solo, elevação/inclinação, cobertura solar, hidrografia, presença de inimigos naturais de mosquitos/larvas e desastres naturais. Cada um

desses fatores pode afetar os casos de malária positivamente ou negativamente, e os efeitos podem ser modificados dependendo de como eles interagem uns com os outros<sup>22</sup>.

Sabe-se que a hidrografia e a temperatura local estão fundamentalmente ligadas às taxas vitais do mosquito e do parasita da malária. Em estações chuvosas, o nível de água dos rios aumenta drasticamente, alcançando áreas próximas das margens. Quando a estação chuvosa termina, o nível da água diminui e conjuntos de água adequados para reprodução de mosquitos aparecem devido à irregularidade do terreno<sup>23</sup>. A transmissão da malária é restrita a temperaturas entre 16°C e 34°C, com transmissão ideal a 25°C<sup>24</sup>.

Neste contexto, a infecção inicia-se quando os esporozoítos (parasita) são inoculados na pele pela picada do vetor, os esporozoítos irão invadir os hepatócitos, multiplicar-se e dar origem a milhares de novos parasitas (merozoítos), que rompem os hepatócitos e, caindo na circulação sanguínea, vão invadir as hemácias. É nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária, conforme mostra a Figura 1. As consequências da infecção irão depender da espécie do *Plasmodium* e do nível de imunidade do hospedeiro<sup>21,25</sup>.

**Figura 1:** Ciclo de transmissão da malária



**Fonte:** Adaptado de Phillips e colaboradores (2017)

A Figura 1 representa o ciclo de transmissão da malária, que se inicia quando a fêmea do mosquito *Anopheles* transmite o *Plasmodium* aos seres humanos durante a picada. Dentro de 30

a 60 minutos, os esporozoítos invadem as células do fígado, onde se replicam e dividem como merozoítos. A célula infectada do fígado se rompe, liberando os merozoítos na corrente sanguínea, onde eles invadem as hemácias e começam o estágio de reprodução assexuada, que é o estágio sintomático da doença. Os sintomas se desenvolvem em 4 a 8 dias após a invasão inicial dos glóbulos vermelhos. O ciclo de replicação dos merozoítos dentro dos glóbulos vermelhos dura de 36 a 72 horas (da invasão dos glóbulos vermelhos à hemólise). Assim, a clássica febre da malária ocorre a cada 36-72 horas, quando os eritrócitos infectados lisam e liberam endotoxinas.

A malária congênita é definida como a presença de estágios de *Plasmodium* assexuados no cordão ou sangue periférico do recém-nascido durante a primeira semana de vida como resultado da transferência materno-fetal de parasitas da malária. Embora as consequências da malária congênita possam pôr em perigo a vida, pouco se sabe sobre o impacto da infecção na saúde do bebê, já que os sintomas muitas vezes são confundidos com sepse neonatal<sup>26</sup>.

As hipóteses para a transmissão da malária congênita incluem a transfusão materna na circulação fetal no momento do parto ou durante a gravidez ou penetração por ruptura prematura de placenta<sup>27</sup>. Apesar da alta prevalência de parasitemia materna e placentária em áreas endêmicas, a malária congênita é considerada rara<sup>26</sup>. As consequências da malária na gravidez podem ser maiores quando a imunidade materna é mais baixa, desta forma representa um grande risco para a saúde da mãe e do feto. Nas gestantes, o quadro clínico de malária resulta em anemia, edema pulmonar, hipoglicemia, malária cerebral, sepse puerperal e até óbito. Já no feto, pode resultar em abortos ou em outras complicações, como a prematuridade, restrição de crescimento intra-uterino e o baixo peso ao nascer<sup>28</sup>.

Uma fase sintomática inicial, caracterizada por mal-estar, cefaleia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. O ataque paroxístico inicia-se com calafrio que duram quinze minutos a uma hora, sendo seguido por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais. Após um período de duas a seis horas, o indivíduo apresenta sudorese profunda e fraqueza intensa. Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* e 72 horas para *Plasmodium malariae*. Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum nos dias atuais, em decorrência do tratamento precoce realizado ainda na fase de assincronismo das

esquizogonias sanguíneas, das infecções por populações distintas de plasmódios e por infecção em hospedeiros não-imunes por retardo da resposta imune específica<sup>29</sup>.

Além dos ataques paroxísticos, outra forma de manifestação da malária são os diferentes sinais neurológicos focais, além de alterações cognitivas e comportamentais<sup>30</sup>. Existe uma correlação de diferentes manifestações clínicas com achados histopatológicos de material *post-mortem* humano, demonstrando acúmulo de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, adesão endotelial ou acúmulo de leucócitos mononucleares e plaquetas nos capilares cerebrais, sinais morfológicos de ativação de astrócitos e microglia, presença de hemorragia no parênquima cerebral, lesão axonal e desmielinização, além de edema cerebral, principalmente no estágio final da doença<sup>31</sup>.

#### 1.1.1.1 Malária Cerebral

A MC é uma das principais complicações da infecção por *Plasmodium falciparum*. Aproximadamente 500 mil crianças desenvolvem MC na África a cada ano e a condição está associada a uma taxa de mortalidade de 15-25%<sup>32</sup>. A MC é uma síndrome clínica definida como uma encefalopatia difusa potencialmente reversível, caracterizada principalmente por coma, convulsões, alterações cognitivas, comportamentais e motoras<sup>33</sup>. A encefalopatia e as convulsões geralmente se resolvem dentro de 2-3 dias, em conjunto com o tratamento antipalúdico e cuidados de suporte. Aproximadamente 19,2% dos indivíduos evoluem para o óbito em decorrência da MC, mas 25% dos sobreviventes de MC infantil desenvolvem sequelas neurológicas de longo prazo, mesmo após receberem tratamento adequado<sup>34,35</sup>.

Pode-se supor que os prejuízos comportamentais e cognitivos na MC ocorram devido a danos nos lobos frontais (associado a funções executivas), áreas de lóbulos temporal medial e o sistema hipocampal (envolvido na formação da memória)<sup>36</sup>. Episódios de epilepsia são frequentemente relatos e acometem mais de 60% das crianças com MC mesmo após a admissão hospitalar<sup>37</sup>. As principais

alterações clínicas persistentes incluem *déficits* motores, alterações sensoriais e transtornos cognitivos e comportamentais<sup>35</sup>.

O desenvolvimento do cérebro continua por um longo período pós-natal. Nos primeiros 5 anos de vida, o cérebro sofre um rápido aumento de tamanho, quadruplicando em volume para atingir aproximadamente 90% do tamanho adulto final. É nesta fase que ocorre o desenvolvimento e diferenciação de células gliais, mielinização progressiva de matéria branca e poda sináptica<sup>37</sup>. Agressões a um cérebro em desenvolvimento está associado a disfunções nos processos de mielinização, crescimento axonal e dendrítico, sinaptogênese e proliferação de microglia e astrócitos<sup>38</sup>. Alterações no circuito neuronal durante a primeira infância podem ser nocivos para memória, linguagem e aprendizagem. Entretanto, as mudanças mais sutis que envolvem sensibilidade social, integração social e funções executivas podem aparecer tardiamente, quando tais habilidades tornam-se importantes<sup>39</sup>.

Torna-se compreensível que durante o tempo de aperfeiçoamento dos circuitos neuronais e da mielinização, um insulto neuroinflamatório como a MC, poderia ter repercussões distintas para a função neuropsiquiátrica e explicar algumas das diferenças na apresentação e desfecho da MC entre crianças e adultos. Pacientes pediátricos com MC apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados com adultos, porém sequelas neurocognitivas são comumente relatadas em crianças devido a vulnerabilidade cerebral<sup>40</sup>.

A MC ainda é conhecida por ser uma doença complexa e de patogênese pouco compreendida, visto que a sua fisiopatologia envolve a ativação imune, a redução dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e também possui a presença de estresse oxidativo<sup>41,42,43</sup>. Sabe-se que na MC há o envolvimento de um componente vascular com bloqueio venular induzido pelo parasita, ativação plaquetária, alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e um componente inflamatório com ativação de astrócitos, microglia, sistema complementar e linfócitos<sup>44</sup>.

Uma característica bem definida na patogênese da malária é o sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura de vários órgãos, incluído o sistema nervoso central (SNC). Alguns mecanismos poderiam, individualmente ou em

combinação, resultar em aumento do volume cerebral como resultado do sequestro. O edema citotóxico pode ser uma consequência dos distúrbios de perfusão, lesões metabólicas e morte celular; enquanto o edema e a inflamação vasogênica podem ser causados por ativação de células endotéliais, levando a um aumento da permeabilidade da BHE. O sequestro intenso hemácias parasitadas nas vênulas pós-capilares pode levar a obstrução venosa e congestionamento vascular e anemia; ou ainda convulsões e febre. Estes achados estão associados a um aumento do fluxo sanguíneo cerebral e disfunção dos sistemas autorreguladores<sup>45,46</sup>.

As alterações metabólicas causadas pelo bloqueio do fluxo sanguíneo cerebral decorrente do sequestro de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas na microvasculatura e a ativação do sistema imune em resposta à infecção, com consequente secreção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) pelo hospedeiro, têm sido descritos como os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da MC<sup>47</sup>. A presença de mediadores inflamatórios no microambiente vascular pode levar a alterações na estrutura da BHE, hemorragia, apoptose de células endoteliais e astrócitos, danos neuronais e, conseqüentemente, aos sintomas neurológicos<sup>29</sup>.

A BHE é crucial para manter a homeostase do SNC e para limitar a penetração de toxinas e patógenos no cérebro. A maturação da BHE no período pós-natal é determinada pela formação e interações estáveis célula a célula dentro dos componentes da unidade neurovascular e reguladas por hormônios, citocinas e neurotransmissores<sup>48,49</sup>. A interrupção da integridade da BHE durante a infecção por *Plasmodium falciparum* é uma característica da MC. Durante a infecção, o endotélio e a unidade neurovascular, que compõe o BHE, sofre mudanças marcantes durante o desenvolvimento, alterando funções cerebrais importantes como a poda sináptica, a mielinização, e a maturação e diferenciação de células gliais<sup>40</sup>.

O fenótipo das células endoteliais ativadas é permeável, pró-trombótico e pró-inflamatório e, quando se encontra em um local de infecção ou lesão, é essencial para o remodelamento vascular e o reparo, o tráfico de leucócitos e o sequestro ou erradicação de agentes patogênicos ou toxinas. No entanto, a mesma resposta

endotelial pode ser prejudicial se for descontrolada, persistente ou generalizada. Muitas doenças infecciosas comuns e graves, incluindo a sepse, a síndrome hemolítico-urêmica, a MC e a febre hemorrágica da dengue, são caracterizadas por permeabilidade vascular excessiva, trombose microvascular e inflamação que resultam em disfunção das células endoteliais e comprometimento da BHE<sup>50,47</sup>.

Em um modelo animal de MC foi observado um aumento acentuado da permeabilidade da BHE, evidenciado pela mensuração do corante azul de Evans no tecido cerebral e também por exames histológicos que demonstram evidências de edema perivascular, ocorrendo simultaneamente com a detecção dos sinais clínicos iniciais de MC, como aumento do rolamento e adesão de leucócitos e também diminuição da densidade capilar cerebral<sup>41</sup>.

A neuroinflamação é uma forma de resposta inflamatória no SNC, que é significativamente afetada pelo estado da atividade neuronal e pela permeabilidade da BHE. As respostas inflamatórias moderadas podem proteger o SNC, enquanto uma inflamação intensa agrava o comprometimento da homeostase do tecido<sup>51</sup>. A regulação das respostas neuroinflamatórias são muitas vezes o resultado da cooperação entre diferentes quimiocinas, citocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO) e mensageiros secundários. A maioria desses fatores são secretados pela microglia ativada, que suporta as conexões sinápticas e melhora as respostas imunológicas do SNC<sup>52</sup>. A microglia é a mediadora chave da resposta coordenada à infecção pelo sistema imunológico periférico e pelo SNC. A microglia responde e propaga sinais inflamatórios iniciados na periferia, desempenhando papéis cruciais tanto na proteção neuronal quanto na patologia e muitas vezes são chamadas de "espada de dois gumes". Em um lado, secretam fatores neurotróficos fundamentais para o reparo celular e recrutamento de células imunes no cérebro para depuração de infecção ou detritos celulares. Por outro lado, a ativação crônica ou exagerada da microglia está ligada à secreção excessiva de fatores pró-inflamatórios e implicam o sistema imunológico em uma série de transtornos com origens conhecidas ou suspeitas de desenvolvimento, incluindo a esquizofrenia, os transtornos de ansiedade e depressão e disfunção cognitiva<sup>53</sup>. Após a ativação, a microglia produz citocinas pró-inflamatórias incluindo a interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>54</sup>.

A ideia de que indivíduos que sobrevivem a MC recuperavam-se completamente foi consolidada durante muitos anos, contudo, hoje já é reconhecido que crianças acometidas pela MC sustentam lesões cerebrais significativas em longo prazo. As sequelas da MC acometem diversos sistemas e há relatos da presença de complicações após 10 anos do foco infeccioso. Entre os principais acometimentos, destaca-se os episódios de convulsões, espasticidade, distonia, deficiências no uso de linguagem, comprometimento cognitivo, dificuldades comportamentais (déficit de atenção, hiperatividade, impulsividade, condutas auto-prejudiciais) e ainda sequelas neuropsiquiátricas (psicose, alucinações e catatonia)<sup>34</sup>.

Examinar as implicações a longo prazo de doenças neuro-infecciosas, como a MC, têm ganhado importância, visto que a taxa de mortalidade diminuiu e ainda não há intervenções para as crianças que desenvolveram a MC e nenhum programa de acompanhamento para identificar os indivíduos afetados, sendo que 25% dos sobreviventes de malária cerebral apresentam déficit neurocognitivo de longo prazo e convivem com problemas de saúde mental<sup>55</sup>.

Em 1881, um médico alemão chamado Emil Kraepelin defendeu que as doenças psiquiátricas são principalmente causadas por alterações genéticas e biológicas. Em sua tese, ele enfatizou e discutiu a possibilidade de classificar transtornos mentais com episódios de febre, supondo que a febre possa ser um fator patogênico universal associadas a transtornos psiquiátricos, influenciando a condutividade dos nervos, alterando o fluxo sanguíneo do SNC, causando septicemia, uremia e enzimas decorrentes de agentes infecciosos. Após esta seção teórica, Kraepelin analisou a literatura em relação às doenças agudas mais importantes que foram relatadas como associadas a transtornos psiquiátricos. Estas doenças agudas incluíram a malária, o reumatismo articular agudo, a pneumonia, a pleuresia, a varíola, a escarlatina, o sarampo, a erisipela, o tifo e a cólera. As teorias psiquiátricas de Kraepelin dominaram o campo da psiquiatria no início do século XX e a base dessas teorias continua sendo utilizada até os dias de hoje<sup>56</sup>.

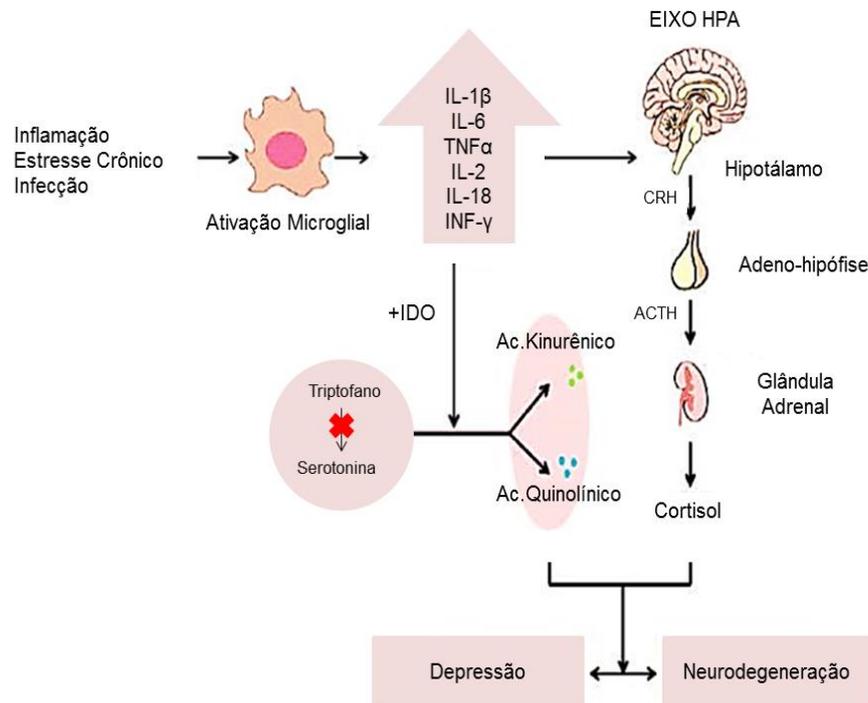
Estudos epidemiológicos mostraram que a neuroinflamação, tanto no início da infância quanto na adolescência, predispõe-se ao desenvolvimento de problemas de saúde mental na idade adulta<sup>13,14,15</sup>. Em um estudo comparando indivíduos com

infecção no SNC durante a infância com um grupo controle acompanhados até 27 anos de idade, encontrou um aumento de casos de esquizofrenia no grupo infecção<sup>57</sup>. Algumas hipóteses, incluindo alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, respostas imunológicas anormais, moleculares e epigenéticas de plasticidade, foram propostas para explicar as vias neurobiológicas que ligam as adversidades infantis ao posterior desenvolvimento de transtornos mentais na vida adulta<sup>58</sup>.

Evidências sugerem que a malária e a MC estão associadas a deficiências neurológicas e comportamentais a longo prazo, porém, o mecanismo subjacente às sequelas ainda são pouco esclarecidas<sup>59</sup>. Idro (2016) sugere que, desde 1994, a MC pode ser responsável por graves problemas de saúde mental em pelo menos 30.000 crianças anualmente nas regiões endêmicas da malária na África, no entanto estes transtornos psiquiátricos ainda não estão bem definidos<sup>60</sup>. Uma coorte retrospectiva baseada na população de Taiwan encontrou uma associação entre infecção por enterovírus com aumento do risco de transtornos depressivos em crianças e adolescentes. O estudo ainda sugeriu que crianças que sofreram agressão infecciosa no SNC devem receber avaliação psicológica adequada e acompanhamento da depressão<sup>61</sup>.

A causa da transição de um desafio imune para um problema de saúde mental ainda não está claro, no entanto, na literatura já existe uma forte associação entre a inflamação prolongada e a susceptibilidade à depressão. A ação da microglia ativando a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e macrófagos liberando citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) é um mecanismo chave subjacente a alterações do humor, pois está associado a mudanças funcionais de neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina<sup>62</sup>. Desta forma, ainda é uma questão de debate se um estado inflamatório crônico pode contribuir para a etiologia da depressão ou se a inflamação ocorre como consequência de um estado depressivo. No entanto, a neuroinflamação prolongada pode promover a supressão da neurogênese e neuroplasticidade, aumentando ainda mais o desenvolvimento de sintomas semelhantes à depressão, sugerindo que uma inflamação prévia pode servir de base para o surgimento de quadros depressivos<sup>11,63</sup>, conforme mostra a figura 2.

**Figura 2:** Hipótese: Desafio imune na fisiopatologia da depressão.



**Fonte:** Adaptado de Feltes e colaboradores (2017)

A Figura 2 demonstra uma hipótese do envolvimento imune na fisiopatologia do transtorno depressivo maior, a partir de desafios inflamatórios, infecciosos ou estresse crônico que podem resultar na ativação da microglia. A microglia ativada produz citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para a neurodegeneração e distúrbios depressivos através da hiper-ativação do eixo HPA e o aumento da atividade enzimática da IDO. A hiperativação do eixo HPA leva ao aumento do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e cortisol que perturbam a homeostase do neurotransmissor (principalmente serotoninérgicos) e a síntese do fator de crescimento neuronal. A IDO diminui a síntese de serotonina, trocando o equilíbrio entre a produção de serotonina do triptofano e a produção de ácido kinurenico e ácido quinolínico. O esgotamento da serotonina leva a sintomas depressivos.

### 1.1.2 Transtorno depressivo maior

O transtorno depressivo maior é um transtorno psiquiátrico que afeta cerca de 20% de indivíduos, sendo caracterizado por humor deprimido, anedonia e função cognitiva alterada<sup>64</sup>. Um estudo de projeção e um relatório da OMS indicam que o transtorno depressivo possa se tornar um dos contribuintes mais importantes para o

carga global de doença entre 2020 a 2030, sendo a doença mais incapacitante no mundo, por causa das limitações físicas e mentais<sup>65,66</sup>. O último relatório da OMS registrou que há 322 milhões de pessoas vivendo com esse transtorno mental no mundo. A prevalência é maior entre as mulheres. O relatório ainda mostra que a depressão atinge 5,8% da população brasileira, o que represente 11,5 milhões de brasileiros<sup>67</sup>. A condição ainda permanece mal compreendida, apesar de muitos esforços, os mecanismos etiológicos subjacentes à depressão ainda são pouco claros. Uma razão importante para isso pode encontrar-se na heterogeneidade do do quadro, tanto em termos das possíveis variações nos padrões de sintomas quanto na trajetória<sup>68</sup>.

A depressão está associada a uma ampla gama de alterações em diferentes sistemas: emocional, cognitivo, psicomotor, neurovegetativo, neuroendócrino e neuroquímico. Dessa forma o quadro clínico da depressão resultaria da complexa interação de processos biológicos (resposta ao estresse, fatores neurotróficos), psicológicos (personalidade e relacionamentos pessoais), ambientais (dieta, álcool, ritmos biológicos) e genéticos<sup>69</sup>. Estudos de imagem cerebral demonstram uma redução de aproximadamente 5% no volume das regiões límbicas, principalmente no hipocampo e no córtex pré-frontal de indivíduos com transtorno depressivo maior quando comparados com indivíduos saudáveis<sup>70</sup>.

A hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na depressão é um dos achados mais consistentes em psiquiatria<sup>68</sup>. Um percentual significativo de pacientes com depressão apresentam concentrações aumentadas de cortisol no plasma, na urina e no fluido cerebrospinal, resposta exagerada de cortisol após estimulação com hormônio adrenocorticotrófico e aumento do volume tanto da hipófise como das glândulas adrenais<sup>71</sup>. Os hormônios desempenham um papel crítico no desenvolvimento e expressão de uma ampla gama de comportamentos. Um aspecto da influência dos hormônios no comportamento é a potencial contribuição para a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e para o mecanismo de ação dos psicotrópicos, particularmente na depressão maior. De todos os eixos endócrinos, o eixo HPA tem sido amplamente estudado, pois exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos. Anormalidades na função do eixo HPA têm sido descritas em sujeitos com diagnóstico de transtornos depressivos<sup>72</sup>.

No desenvolvimento da depressão, alguns biomarcadores encontram-se alterados, como por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias. Há um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ <sup>73</sup>, em contrapartida, os níveis de BDNF estão reduzidos<sup>74</sup>. As características da ativação do sistema imune no transtorno depressivo incluem o aumento nos linfócitos circulantes e fagócitos, aumento da concentração sérica de proteínas de fase aguda, como proteína C-Reativa e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , reduzem a disponibilidade de triptofano, que por sua vez diminui a síntese de serotonina, provocando a uma baixa regulação dos receptores pós-sinápticos. Esta alteração está associada a quadros de fraqueza, letargia, fadiga, perda de apetite e libido reduzida, sugerindo potencial correlação entre depressão e ativação da resposta inflamatória<sup>75</sup>.

Smith (1991) em sua “teoria dos macrófagos na depressão” associa os transtornos depressivos a citocinas. De acordo com sua teoria, as citocinas pró-inflamatórias que são responsáveis pela reação de fase aguda estão associadas a vários aspectos clínicos da depressão, incluindo hiperatividade do eixo HPA, alterações no metabolismo da serotonina e sintomas neurovegetativos<sup>76,77</sup>.

Sintomas de depressão aparecem após citocinas pró-inflamatórias serem produzidas pelo organismo ou administradas de forma exógena. A progressão temporal de um quadro inflamatório para um quadro depressivo sugere uma relação causa-efeito e indica que a ativação imune pode precipitar a depressão<sup>70</sup>. Vários sintomas de depressão induzida por inflamação se sobrepõem com comportamentos de doença, incluindo isolamento do ambiente físico e social, fadiga, mal-estar, alterações no padrão de sono, falta de interesse em atividades diárias ou prazerosas (diminuição da reatividade à recompensa – anedonia), mudanças no apetite e dores inexplicáveis<sup>78,79</sup>. Além disso, alguns componentes do comportamento da doença, como a diminuição da preferência por soluções doces e a redução da exploração social, são melhorados pelo tratamento com antidepressivo<sup>78</sup>.

Outro fator importante no processo fisiopatológico dos transtornos depressivos são as neurotrofinas. As neurotrofinas regulam a diferenciação e a sobrevivência de neurônios, modulando a plasticidade e a transmissão sináptica e inibindo a morte celular. O BDNF é uma importante proteína membro da família das

neurotrofinas que está presente em abundância no tecido encefálico, podendo ser encontrado em neurônios e plaquetas, sendo capaz de atravessar a BHE<sup>80</sup>. Há 10 anos, um estudo sugeriu uma hipótese neurotrófica para etiologia da depressão. Esta hipótese propõe que a depressão resulte da diminuição do suporte neurotrófico<sup>81</sup>, e sua desregulação resultaria em atrofia neuronal, diminuição da neurogênese do hipocampo e perda das células gliais<sup>82</sup>. Embora a diminuição de BDNF possa não ser suficiente para causar comportamento depressivo, isto pode aumentar a susceptibilidade ao transtorno<sup>81</sup>. Há evidências da redução dos níveis de BDNF em hipocampo e sangue periférico de sujeitos com diagnóstico de esquizofrenia, depressão e transtorno de humor bipolar. Em contraste, o tratamento com antidepressivos ou antipsicóticos foi capaz de prevenir ou, em algumas circunstâncias, reverter o efeito adverso do estresse na via do BDNF<sup>83</sup>.

#### **1.1.4 Modelo animal de Malária Cerebral**

##### **1.1.5**

A avaliação da patogênese da MC é limitada, visto que a maior parte dos dados disponíveis é de estudos de autópsia, no entanto, estes estudos não podem abordar as possíveis diferenças nos sobreviventes em comparação com aqueles que vão a óbito. Dada esta limitação, a maioria dos estudos de patogênese vêm sendo realizados em modelos animais<sup>34</sup>.

Foi observado que a linhagem de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) manifestam muitas características do processo infeccioso que ocorre em seres humanos, justificando o uso do modelo para MC por meio das células alteradas que desempenham um papel central na lesões, as semelhanças entre antígenos de malária definidos em roedores e entre as vias de resposta imune<sup>84</sup>.

Estudos demonstraram que camundongos geneticamente susceptíveis e infectados com a cepa ANKA podem apresentar angústia respiratória com acidose láctica, anemia e nefrite, indicando que os mesmos podem desenvolver manifestações clínicas semelhantes à malária por *Plasmodium falciparum*. Estas linhagens também apresentam sinais neurológicos e sintomas típicos da MC (coma,

paralisia e crise epiléptica), assim como alterações cerebrais microscópicas, como ativação de células endoteliais e microglia<sup>85</sup>.

Vale destacar, que a extrapolação dos resultados obtidos no modelo experimental de MC deve ser realizada com muito cuidado, visto que modelos animais não conseguem reproduzir todas as características da doença humana<sup>86</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros relacionados à depressão em camundongos adultos submetidos à malária cerebral no período infante.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o consumo de sacarose e o tempo de imobilidade.
- Verificar o peso ponderal.
- Verificar o peso do hipocampo e da glândula adrenal.
- .Analisar níveis séricos de corticoesterona.
- Determinar os níveis de BDNF no hipocampo.
- Determinar os níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é do tipo experimental com uso de um modelo animal. Foi realizada no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), campus Pedra Branca.

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste estudo foi utilizado cloroquina (Farmanguinhos, Brasil); imipramina (Tofranil, Novartis, Brasil); tampão fosfato salina (Laborclin, Brasil); kit panótico (Laborclin, Brasil); sacarose (Merck, Brasil); balança digital (Powner, Brasil); balança de precisão (Shimadzu – AUY220, Brasil); centrífuga refrigerada (Solab Científica, Brasil); microscópio (Nikon, Japão); leitor de microplaca (Perlong Medical DNM-9602, China); kit ELISA para BDNF e IL-1 $\beta$  (Genese, Brasil); câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha).

#### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados 58 camundongos machos, da linhagem (C57BL/6), que não possuíam qualquer anormalidade anatômica, funcional/doenças ou machucados, pesando entre 15 e 18g, com 21 dias de vida, provenientes do biotério de criação da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os animais foram mantidos no biotério experimental do LANEX-UNISUL, sendo mantidos em 5 animais por caixa, sob regime cíclico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (luzes ligadas às 6h e desligadas as 18h) e com livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}$  C. Os animais foram aclimatados aos laboratórios por pelo menos 1h antes dos procedimentos, que foram realizados entre 8h e 12h.

O número de animais por grupo foi calculado em  $n=8$ . A fórmula empregada para o cálculo foi a equação  $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$ , para comparação de

duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%.

Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais deve ser utilizado em cada grupo experimental para ser possível identificar que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não observar diferenças onde elas existam, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não existam. Para segurança e confiabilidade dos dados, foi utilizado 10 animais por grupo neste estudo.

### 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

#### 3.4.1 Infecção

Primeiramente, dois animais (animais de passagem), receberam 200µl de sangue infectado, tendo por finalidade a replicação do *Plasmodium berghei* ANKA até atingir a parasitemia de 10%. O sangue infectado utilizado neste estudo é proveniente da Fundação Oswaldo Cruz. Com relação a medidas de biossegurança, vale ressaltar que o agente biológico utilizado no estudo pertence à Classe de risco 1 (baixo risco), desta forma não demonstra capacidade comprovada de causar doença no homem ou animais adultos sadios<sup>87</sup>.

A partir dos animais oriundos do procedimento de passagem, foi coletado sangue na ponta da cauda do animal para realizar o esfregaço em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas pelo método Romanowsky e posteriormente avaliado a parasitemia em microscópio óptico. A parasitemia foi analisada em pelo menos 3 quadrantes da lâmina, cada campo contendo 100 hemácias e dentro deste campo foi contabilizado número de hemácias infectadas. Resumidamente, os valores da parasitemia são realizados de acordo com a quantidade de hemácias infectadas e percentagem que representa o total de hemácias no campo. O animal que apresentou parasitemia desejada, entre 10-20%, foi anestesiado e coletado o sangue<sup>43</sup>.

O sangue coletado foi diluído em microtubos na proporção de 1:1000, sendo 1µl de sangue para 1000µl de PBS. Após a diluição, 10 µL da solução foram aplicados na câmara de Neubauer e o número de células foi contado. O número de células/mL foi avaliado pela seguinte fórmula:  $N = \text{cel} \times 5 \times 10^3 \times 10^4 = \text{célula/mL}$ . Onde: Cel = Número total de células contadas em 5 quadrantes multiplicados por 5 (para dar 25 quadrantes), multiplicado pela diluição da amostra (1000) e por quantas vezes o líquido é diluído na câmara (10.000). Após a contagem, foi calculado o volume de sangue necessário para inocular  $10^6$  hemácias parasitadas.

Cada animal foi infectado com *Plasmodium berghei* ANKA, a partir da injeção de 100µL contendo  $10^6$  hemácias parasitadas, via intraperitoneal. A parasitemia foi observada no 3º e 6º dia pós-infecção por confecção de lâminas histológicas coradas. No 6º dia pós-infecção os animais receberam uma dose diária de cloroquina (antimalárico), na dose de 25 mg/kg, por gavagem, uma vez por dia, durante 7 dias. O tratamento com cloroquina se faz necessário para garantir a sobrevivência dos animais com MC, visto que o fármaco reduz a parasitemia. Já foi observado que camundongos C57BL/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA apresentam altas taxas de mortalidade entre o 7º e 10º dias pós-infecção<sup>43</sup>.

### 3.4.2 Delineamento do experimento

Após a indução, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais → G1: RBC+PBS; G2: RBC+IMIPRAMINA; G3: PbA+PBS; G4: PbA+IMIPRAMINA. Os grupos RBC receberam  $10^6$  hemácias não-infectadas (animais do grupo controle). Os grupos PbA foram animais infectados com  $10^6$  hemácias parasitadas provenientes dos animais de passagem.

Inicialmente foi necessário identificar se existe diferença nos parâmetros relacionados à depressão entre os grupos G1 e G3, e a partir destas, verificar se tais parâmetros seriam revertidos com a imipramina, nos grupos G2+G4.

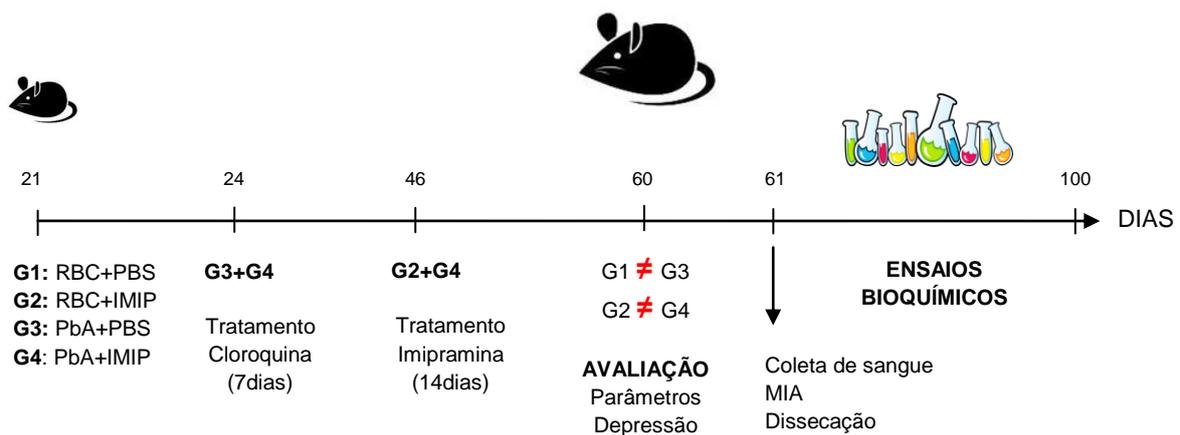
Os animais dos grupos G2 e G4 iniciaram o tratamento com imipramina quando completarem 46 dias de vida, na dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal, uma vez por dia, durante 14 dias. O tratamento com imipramina (antidepressivo) foi

utilizado para validar os parâmetros relacionados à depressão, garantindo a validade preditiva que um modelo animal de depressão exige<sup>88,89</sup>.

Ao completarem 60 dias de vidas, todos os animais foram avaliados pelos seguintes parâmetros: comportamento relacionado à depressão (suspensão da cauda), comportamento anedônico (preferência por solução de sacarose durante 24 horas), perda de peso, peso da glândula adrenal, níveis de corticoesterona, níveis de BDNF e de IL-1 $\beta$  no hipocampo.

O peso corporal dos animais foi avaliado no dia da infecção e após o teste de anedonia. Ao fim do teste de anedonia, os animais foram anestesiados e realizada a punção cardíaca para retirada do sangue. O sangue foi centrifugado e o plasma utilizado para dosagem dos níveis de corticoesterona. Na sequência os animais foram submetidos à morte indolor assistida (MIA), a glândula adrenal foi dissecada e pesada. O hipocampo também foi dissecado, pesado, homogeneizado e mantido no freezer -80°C para posterior análise dos níveis de BDNF e IL-1 $\beta$ .

**Figura 3:** Etapas do Experimento



### 3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

#### 3.5.1 Avaliação do peso ponderal

O peso corporal dos animais foi avaliado em gramas no início do experimento e após o teste de anedonia em uma balança de peso simples<sup>89</sup>.

#### 3.5.2 Preferência por solução de sacarose

Para determinar a melhor concentração de sacarose foram utilizados 18 animais, sendo estes divididos e expostos a seis doses diferentes. As doses utilizadas foram de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3%, a partir da curva de preferência dos animais, a melhor concentração de sacarose foi utilizada. Esta análise foi realizada com a exposição do animal à solução de sacarose durante 24 horas, sendo que não haverá privação de água e comida para a realização do teste.

A preferência de sacarose foi medida por meio da pesagem das garrafas de água e de sacarose antes do teste e após 24 horas, usando a diferença para o cálculo da preferência de sacarose, que é feita através da equação abaixo:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{consumo total de sacarose} \times 100}{\text{consumo total (H}_2\text{O} + \text{sacarose)}}.$$

O parâmetro utilizado foi o estabelecimento da curva de preferência dos animais, e a partir disto a melhor concentração foi estabelecida<sup>88</sup>.

#### 3.5.3 Teste de suspensão pela cauda

O teste baseia-se na observação e contabilidade do tempo total de imobilidade do animal durante 6 minutos. No momento da avaliação, os camundongos são isolados em uma plataforma, sendo suspensos pela cauda a uma altura de 35cm do chão, utilizando uma fita adesiva colocada a aproximadamente 1cm da ponta da cauda. É proposto que substâncias com atividade antidepressiva diminuam o tempo de imobilidade dos animais neste teste<sup>91</sup>.

### **3.5.4 Avaliação do peso do hipocampo e da glândula adrenal**

O hipocampo e a glândula adrenal foram dissecados e avaliados em gramas, por uma balança de precisão<sup>90</sup>.

### **3.5.5 Avaliação dos níveis séricos de corticoesterona**

Os animais foram anestesiados e as amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca<sup>91</sup>. O sangue coletado foi depositadas em microtubos que foram submetidos à centrifugação a 4.000 rotações por minuto durante 10 minutos. Para as dosagens dos níveis plasmáticos de corticoesterona, as amostras foram coletadas com anticoagulante (heparina). Após a centrifugação, o plasma foi armazenados em freezer a -80°C.

### **3.5.6 Avaliação dos níveis de BDNF e IL-1 $\beta$ em tecido hipocampal**

Após a MIA, o hipocampo foi homogeneizado e armazenado no freezer -80°C para posterior análise bioquímica<sup>90</sup>. Os níveis de BDNF e de IL-1 $\beta$  no hipocampo foram mensurados por um kit ELISA sanduíche anti-BDNF e -IL-1 $\beta$ , de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o hipocampo foi homogeneizado em solução tampão de fosfato com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, e 1 mM de EGTA. As placas de microtitulação de 96 poços (de fundo plano) foram revestidas durante 24 horas com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra e padrão de curva.. Os poços foram em seguida lavados quatro vezes com diluentes de amostra e um anticorpo de coelho anti-BDNF e anti-IL-1 $\beta$  monoclonal diluído a 1: 1000 em diluente da amostra foi adicionado a cada poço e incubado durante 3h à temperatura ambiente. Após a lavagem, um anticorpo peroxidase anti-coelho conjugado (diluído a 1: 1000) foi adicionado a cada poço e incubado à temperatura ambiente durante 1h. A quantidade de BDNF e IL-1 $\beta$  foram determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica e concentração de BDNF e IL-1 $\beta$ . A proteína total no hipocampo foi medida pelo método BCA, utilizando albumina de soro bovino como um padrão.

### 3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

VARIÁVEIS	TIPO	NATUREZA	UTILIZAÇÃO
Infecção MC	Independente	Qualitativa – Nominal Dicotômica	Sim / Não
Cloroquina	Independente	Qualitativa – Nominal Dicotômica	Sim / Não
Imipramina	Independente	Qualitativa – Nominal Dicotômica	Sim / Não
Peso corporal	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas
Comportamento depressivo - Anedônico	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas/ml
Comportamento depressivo - Imobilidade	Dependente	Quantitativa – Contínua	Segundos
Peso do hipocampo / glândula adrenal	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas
Concentrações de Corticoesterona	Dependente	Quantitativa – Contínua	ng/ml
Concentrações de BDNF	Dependente	Quantitativa – Contínua	pg/ml
Concentrações de IL-1 $\beta$	Dependente	Quantitativa – Contínua	pg/ml

### 3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta dos dados foi realizado um teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*) para caracterização dos dados. Como os dados foram paramétricos, os resultados foram apresentados como a média e desvio-padrão. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando o valor de  $p$  foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi submetido à comissão de ética no uso de animais experimentais (CEUA) da UNISUL, conforme registro 18.001.4.01.IV e só foi executado após a sua aprovação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

No teste para a determinação da melhor concentração de sacarose, foram oferecidas soluções em diferentes concentrações, que variaram entre 0,5% a 3,0%. A partir disso, foi estabelecida a curva de preferência de sacarose, no qual um consumo entre 50% e 70% foi considerado a melhor concentração. Foi observado que a melhor concentração foi a de 1% de sacarose, pois se manteve entre 50% e 70% (**Figura 4**). Esta concentração foi à utilizada na avaliação da preferência por sacarose.

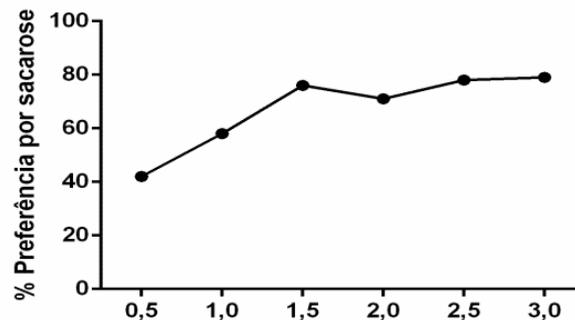


Figura 4. Determinação da concentração ideal de sacarose. Os dados foram expressos por média e desvio padrão (n=20). Concentração ideal definida por consumo preferencial de sacarose de 50-70% dos animais, ou seja, 1%.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA PREFÊRENCIA POR SACAROSE

A **Figura 5** demonstra os resultados obtidos após o teste de anedonia, através do consumo de sacarose. Foi possível observar que os animais expostos à MC no período infante não apresentam diferença significativa entre os grupos avaliados neste estudo, ou seja, não apresentaram um comportamento anedônico quando adultos.

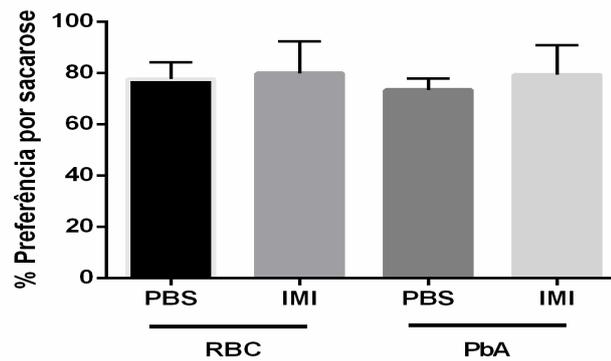


Figura 5: Teste de anedonia através da preferência por consumo de sacarose. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $p > 0,05$ .

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA IMOBILIDADE

A **Figura 6** representa os resultados obtidos após a realização do teste de suspensão pela cauda, utilizado para avaliar o tempo de imobilidade. Pode-se observar que os animais do grupo PbA+PBS apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo RBC+PBS ( $F_{(3,63)}=36.98$ ;  $p < 0,0001$ ). Com o uso da imipramina, os animais expostos a MC no período infante reduziram significativamente o tempo de imobilidade quando comparados aos animais que também foram expostos à MC, mas não receberam imipramina ( $F_{(3,63)}=36.98$ ;  $p < 0,0001$ ).

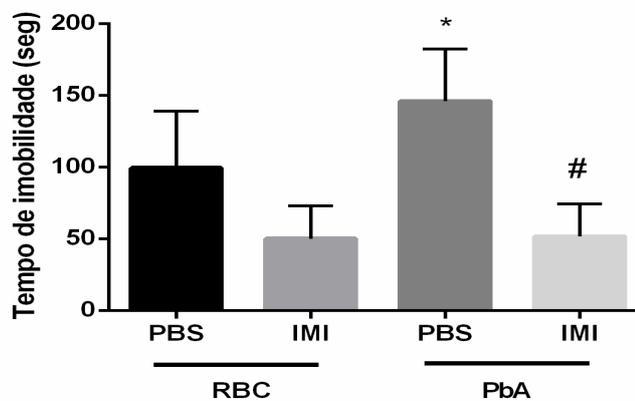


Figura 6: Imobilidade através do teste de suspensão pela cauda. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $^* = p < 0,05$  vs. PBS+RBC;  $\# = p < 0,05$  vs. PbA+PBS.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO PESO PONDERAL

A **Figura 7** expõe os resultados da mensuração do peso ponderal dos animais no início e no final do experimento, quando os animais expostos à MC completaram 60 dias de idade. Pode-se observar que todos os animais ganharam peso, no entanto, os animais expostos à MC no período infante não apresentam diferença significativa entre os grupos avaliados neste estudo com relação ao peso ponderal.

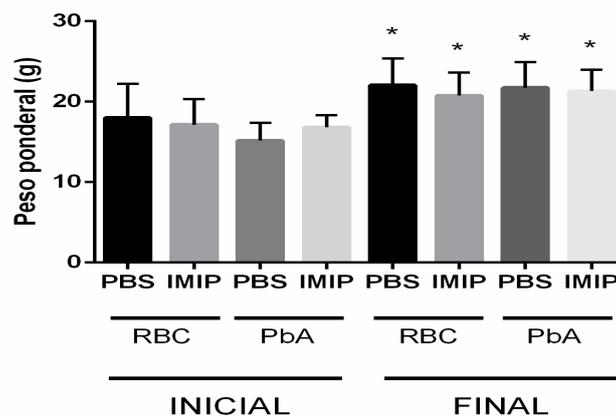


Figura 7: Avaliação do peso ponderal. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $^* = p < 0,05$  vs. Inicial;

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL

A **Figura 8** refere-se aos dados obtidos após a avaliação do peso da glândula adrenal. Demonstrou-se que a exposição à MC no período infante foi capaz de aumentar significativamente o peso da glândula adrenal quando comparado aos animais controles ( $F_{(3,61)} = 12.27$ ;  $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, quando se observa o grupo de animais expostos à MC que receberam imipramina há uma redução

significativa do peso da glândula adrenal em comparação ao grupo de animais expostos à MC que não receberam imipramina ( $F_{(3,61)}=12.27$ ;  $p<0,0001$ ).

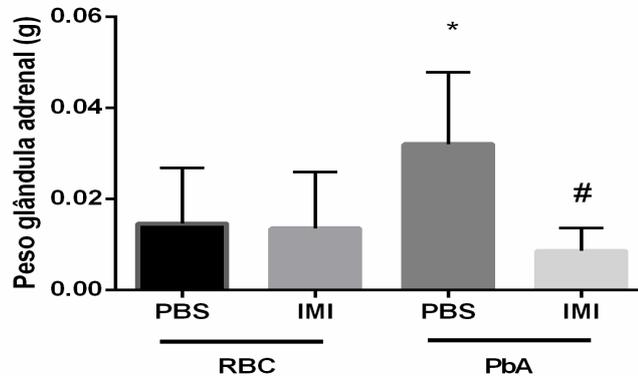


Figura 8: Avaliação do peso da glândula adrenal. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $*=p<0,05$  vs. PBS+RBC;  $\#=p<0,05$  vs. PbA+PBS.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOESTERONA

A **Figura 9** demonstra os resultados da quantificação dos níveis séricos de corticoesterona. Foi possível observar um aumento significativo dos animais submetidos a MC quando comparado ao grupo de animais do grupo RBC ( $F_{(3,24)}=109.0$ ;  $p<0,0001$ ). Já os animais com MC que receberam imipramina apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de corticoesterona quando comparado ao grupo exposto à MC que não recebeu imipramina ( $F_{(3,24)}=109.0$ ;  $p<0,0001$ ).

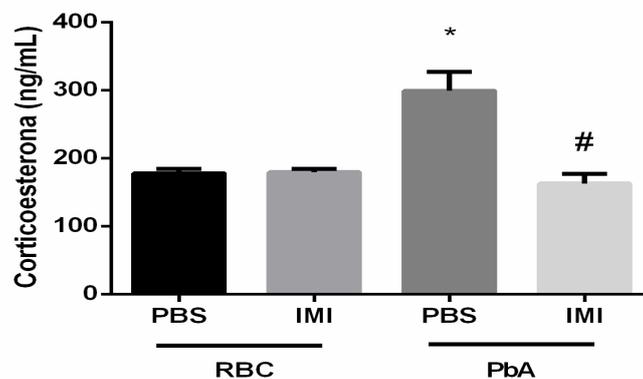


Figura 9: Avaliação dos níveis plasmáticos de corticoesterona. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey. \*= $p < 0,05$  vs. PBS+RBC; #= $p < 0,05$  vs. PbA+PBS.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO PESO DO HIPOCAMPO

A **Figura 10** demonstra os dados obtidos após a mensuração do peso do hipocampo. Pode-se observa-se que a exposição à MC no período infante foi capaz de reduzir significativamente o peso do hipocampo quando comparado aos animais RBC ( $F_{(3,47)}=5.862$ ;  $p=0,0017$ ). Quando se observa o grupo de animais submetidos à MC que receberam tratamento com imipramina na vida adulta durante 14 dias, há um aumento significativo do peso do hipocampo em comparação ao grupo de animais expostos à MC que não receberam imipramina ( $F_{(3,47)}=5.862$ ;  $p=0,0017$ ).

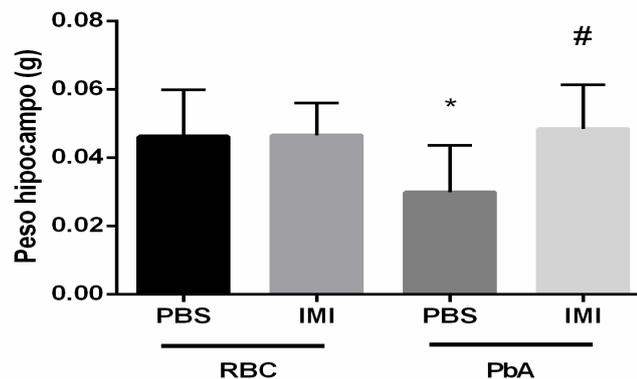


Figura 10: Avaliação do peso do hipocampo. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey. \*= $p < 0,05$  vs. PBS+RBC; #= $p < 0,05$  vs. PbA+PBS.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDO HIPOCAMPAL

A **Figura 11** expõe os valores referente aos níveis de BDNF em tecido hipocampal. Pode-se observar que os animais expostos à MC na fase infante possuem uma redução significativa quando comparados com o grupo de animais que receberam apenas o RBC ( $F_{(3,32)}=6.503$ ;  $p=0,0015$ ). Porém, ao comparar os animais expostos à MC que receberam tratamento com imipramina durante 14 dias

com os animais que também foram expostos à MC, mas que não receberam a imipramina ( $F_{(3,32)}=6.503$ ;  $p=0,0015$ ), foi possível observar um aumento dos níveis de BDNF.

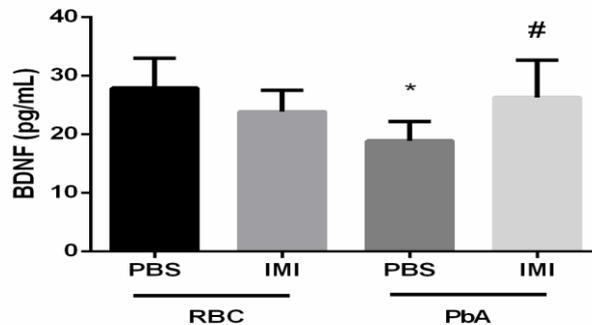


Figura 11: Avaliação dos níveis de BDNF em tecido hipocampal. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $*=p<0,05$  vs. PBS+RBC;  $\#=p<0,05$  vs. PbA+PBS.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1 $\beta$ EM TECIDO HIPOCAMPAL

A **Figura 12** apresenta os dados obtidos na avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$  em tecido hipocampal. É possível observar que os níveis de IL- $\beta$  estão significativamente elevados nos animais que foram expostos à MC quando comparados com os animais RBC ( $F_{(3,16)}=14.69$ ;  $p<0,0001$ ). Entretanto, nos animais expostos à MC que receberam imipramina não foi possível observar uma redução significativa quando comparado aos animais que também foram expostos à MC mas que não receberam o tratamento com a imipramina ( $F_{(3,16)}=14.69$ ;  $p<0,0001$ ).

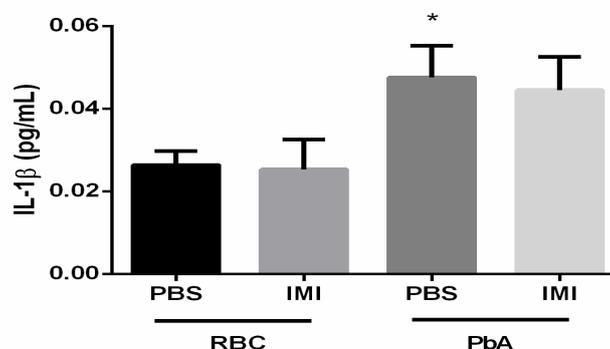


Figura 12: Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$  em tecido hipocampal. Dados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de uma via *post-hoc* tukey.  $*=p<0,05$  vs. PBS+RBC.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que camundongos adultos submetidos à MC no período infante apresentam parâmetros relacionados à depressão verificados através de: 1) maior tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda; 2) hiperativação do eixo HPA pelo aumento no volume da glândula adrenal e elevado nível de corticoesterona; 3) redução do volume do hipocampo; 4) elevado nível de IL-1 $\beta$  em tecido hipocampal; 5) redução do nível de BDNF em tecido hipocampal. Dentre os parâmetros avaliados neste estudo, somente os níveis de IL-1 $\beta$  não foram revertidos com o uso do antidepressivo imipramina. Destaca-se ainda que o peso ponderal dos animais e o teste de preferência por sacarose também foram avaliados, no entanto, não apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), a anedonia pode ser definida como interesse ou prazer diminuído em resposta a estímulos que foram previamente percebidos como recompensadores<sup>92</sup>. Em modelo animal, a anedonia pode ser avaliada através do consumo de sacarose e tem sido estudada a partir de diferentes modelos<sup>93,94,95</sup>. Neste estudo, pode-se observar que não houve alteração no comportamento anedônico nos animais adultos submetidos a MC no período infante. Burstein e colaboradores (2017)<sup>93</sup> demonstraram que o estresse crônico variado induziu menos consumo de sacarose, caracterizando um comportamento anedônico nos animais. Comim e colaboradores (2010)<sup>95</sup> demonstraram que animais adultos submetidos à sepse apresentaram anedonia 14 dias após a indução. Já o estudo de Zhu e colaboradores (2017)<sup>94</sup> observou que camundongos com 60 dias de idade expostos ao LPS exibem comportamentos relacionados depressão como déficit de memória, anedonia e maior tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda. Os autores atribuíram estes resultados a um possível processo neuroinflamatório. Vale destacar que a anedonia é um sintoma isolado e não um estado psicopatológico, ao contrário da depressão da qual ela pode ser um componente, mas que requer a associação de vários outros componentes para atender um diagnóstico<sup>96</sup>.

O diagnóstico de um episódio de depressão requer que cinco ou mais sintomas estejam presentes dentro de um período de duas semanas, sendo que um dos sintomas deve ser, pelo menos, o humor deprimido<sup>97</sup>. Um comportamento característico da depressão é o desamparo aprendido, que em modelo animal pode ser observado através do tempo de imobilidade, no qual se caracteriza através da economia de energia<sup>98</sup>.

Neste estudo foi observado que os animais submetidos à MC apresentaram um tempo de imobilidade significativamente maior quando comparado ao grupo controle e ao grupo que foi tratado com imipramina. Este dado está de comum acordo com outros achados da literatura, visto que o mesmo resultado foi encontrado em camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível leve, sendo o maior tempo de imobilidade revertido após a administração de antidepressivos<sup>99</sup>. Dados semelhantes também foram encontrados nos animais expostos ao LPS com dois dias de vida. Estes animais apresentaram maior tempo de imobilidade e alterações na memória e no aprendizado quando avaliados na vida adulta, apoiando a hipótese de que a ativação imune neonatal pode apresentar repercussões de longo prazo<sup>100</sup>. O estudo de Liu e colaboradores (2018)<sup>101</sup> observaram que a isquemia, utilizando o modelo de oclusão da artéria carótida interna bilateral, causou um comportamento relacionado à depressão em camundongos avaliados no teste de natação forçada e no teste de suspensão pela cauda. Essas alterações foram associadas a apoptose celular nas regiões cerebrais de regulação emocional, incluindo hipotálamo, mesencéfalo, córtex pré-frontal e hipocampo. Por fim, Reis e colaboradores (2010)<sup>102</sup> verificaram que animais adultos submetidos a MC utilizando o mesmo plasmódio, 15 dias após a indução apresentaram um aumento do tempo de imobilidade associado a alterações nos processos de aprendizado e memória. Estes achados, associados aos encontrados neste estudo, são uma forte evidência de que a MC pode provocar alterações significativas no encéfalo associadas à depressão.

Uma coorte realizada no Hospital de Mulago, entre 2008-2014, analisou crianças entre 18 meses e cinco anos de idade que foram diagnosticadas com MC após uma semana da alta hospitalar e acompanhou durante 2 anos. A avaliação ocorreu por meio do CBCL pré-escolar, onde as crianças pontuam nas seguintes escalas: reatividade emocional; ansiedade-depressão; queixas somáticas;

retraimento; problemas com sono; problemas de atenção-hiperatividade e comportamento agressivo. A conclusão do estudo forneceu evidências que os problemas comportamentais são maiores em crianças com MC do que em crianças saudáveis na mesma comunidade e que os problemas comportamentais persistem ao longo do tempo. Destacaram ainda que, possivelmente, os cuidados intensivos e procedimentos invasivos experimentados pelas crianças tenham desempenhado um papel no desenvolvimento subsequente de problemas comportamentais<sup>103</sup>.

Outro parâmetro relacionado a depressão é a alteração de peso. As mudanças no peso, associadas à depressão, são um fenômeno complexo e podem ser influenciadas por fatores específicos da doença, como alterações no apetite, na atividade física e por fatores específicos ligados a algumas classes de antidepressivos<sup>104</sup>. A relação entre peso corporal e depressão tem sido alvo de muitos pesquisadores, visto que os resultados obtidos até o momento são muito controversos. Alguns autores defendem que a depressão tem um impacto significativo tanto na perda de peso quanto no ganho. Já outros demonstraram que os sintomas depressivos estão associados apenas a perda de peso<sup>105,106,107</sup>. E por fim, ainda há autores que não observaram nenhuma associação entre o índice de massa corporal e sintomas depressivos<sup>108,109</sup>. Nesse estudo, os animais submetidos à MC no período infante não apresentaram peso ponderal significativamente maior ou menor quando comparado aos animais controles, ou seja, todos os grupos estudados ganharam peso significativamente. Entretanto, é importante destacar que a ingestão de alimentos não foi avaliada. Em modelos animais de depressão, sabe-se que administração de LPS induz a perda de peso. Lawson e colaboradores (2013)<sup>110</sup> demonstraram que a administração sistêmica de LPS em camundongos com 10 semanas de idade alterou o comportamento alimentar e a ingestão de alimentos e conseqüentemente o peso ponderal.

Neste contexto, a depressão tem sido frequentemente associada à hiperatividade do eixo HPA, visto que os corticosteróides (isto é, cortisol em humanos e corticosterona em roedores), produto final do eixo HPA, atravessam facilmente a BHE para afetar a função cerebral e, portanto, o comportamento<sup>111</sup>. A hiperativação do eixo HPA é modulada pela secreção do CRH no hipotálamo, que ativa o ACTH na hipófise e este estimula a secreção de cortisol pela glândula adrenal, provocando um aumento dos níveis de glucocorticóides, bem como à

interrupção dos mecanismos de *feedback* negativo através da diminuição, expressão e função dos receptores de glicocorticóides<sup>112,113</sup>. Uma resposta neuroendócrina ao estresse é essencial para uma adequada resposta de enfrentamento e posterior recuperação das ameaças que perturbam a homeostase.

Desta forma, a ativação do eixo HPA fornece o suporte metabólico para a resposta ao estresse, mobilizando a energia armazenada, suprimindo a resposta imune e potencializando efeitos mediados simpaticamente<sup>114</sup>. Embora seja uma resposta altamente adaptativa, a elevada liberação de corticosteroides, como consequência da exposição ao estresse extremo ou crônico, pode ser prejudicial ao organismo e contribuir para um estado psicopatológico<sup>115</sup>. Davis e colaboradores (1997)<sup>116</sup> investigaram os efeitos das citocinas no eixo HPA e sua relação com indivíduos com diagnóstico de malária. No total foram nove pacientes, sendo que destes, três indivíduos tiveram MC. Em conclusão, o estudo demonstrou concentrações plasmáticas significativamente maiores de IL-6, de receptor para IL-6 e TNF- $\alpha$  em soro de indivíduos com diagnóstico de MC, no entanto, as concentrações basais de cortisol sérico estavam amplamente distribuídas, visto que foi observados concentrações significativamente maiores nos paciente, mas também níveis dentro da faixa de controle.

Neste estudo, foi observado que animais submetidos à MC no período infante apresentaram alterações nas medidas neuroendócrinas, como aumento do volume da glândula adrenal e elevado nível de corticoesterona no plasma, sugerindo uma correlação positiva com os demais estudos. Resultado semelhante foi demonstrado por Doosti e colaboradores (2013)<sup>117</sup>, que encontraram altos níveis de corticoesterona e associaram a exposição de camundongos neonatos ao LPS com o comportamento relacionado à depressão. Marzzani (2018)<sup>118</sup>, em sua dissertação de mestrado, também verificou que camundongos expostos ao LPS com apenas dois dias de vida, apresentaram comportamento anedônico associado a um aumento do tempo de imobilidade, um aumento do peso ponderal da glândula adrenal e a níveis elevados de corticoesterona em plasma 60 dias após o nascimento. Outro achado consistente deste mesmo estudo foi à diminuição do peso do hipocampo em longo prazo.

O volume reduzido do hipocampo é um dos achados morfológicos mais consistentes nos transtornos de humor<sup>119</sup>. Diversos fatores implicam o hipocampo na patogênese devido a alta sensibilidade ao estresse<sup>120</sup>. Neste sentido, uma metanálise de 32 estudos por ressonância magnética confirmou a diferença no volume hipocampal entre sujeitos com o diagnóstico de depressão e seus controles<sup>121</sup>. Neste estudo destacou-se a acentuada redução no volume do hipocampo nos animais adultos submetidos à MC no período infante, bem como a reversão deste parâmetro após 14 dias de tratamento com imipramina. Em um artigo de revisão foram descritos vários estudos sobre a relação da ativação imune no início da vida e alterações no hipocampo durante o desenvolvimento e na vida adulta. Dentre as alterações estão a redução da sobrevivência de neurônios recém-gerados, diminuição do recrutamento de novos neurônios e na proliferação de células progenitoras e diferenciação neuronal no hipocampo adulto<sup>122</sup>. Logo, observa-se que a redução do volume do hipocampo está relacionada à atrofia, morte neuronal e redução da neurogênese. Estudos mostram que o tratamento com antidepressivos a longo prazo podem promover a neurogênese e, portanto, normalizar o volume do hipocampo e aumentar a síntese de fatores neurotróficos como o BDNF<sup>123,124</sup>.

O BDNF é considerado o fator neurotrófico mais prevalente no SNC, responsável pela sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica, portanto, a falha de tais mecanismos pode aumentar a suscetibilidade a desafios ambientais, como o estresse<sup>125,126</sup>. Esta neurotrofina está envolvida na regulação de certas formas de comportamento, visto que possui a capacidade de estimular a neurogênese e restaurar a atividade funcional, principalmente quando interage com o sistema serotoninérgico<sup>127</sup>. Molendijk e colaboradores (2014)<sup>128</sup> concluíram em uma metanálise que os níveis séricos de BDNF estavam reduzidos em sujeitos com diagnóstico de depressão e que, após um curso de tratamento com antidepressivos, houve um aumento destes níveis. Comim e colaboradores (2012)<sup>129</sup> demonstraram que animais submetidos a MC quando adultos apresentaram baixos níveis de BDNF em hipocampo 15 dias após a indução. Outro achado interessante é que este resultado estava associado a alterações na memória e no aprendizado.

Bangirana e colaboradores (2016)<sup>130</sup> avaliaram a capacidade neurocognitiva de 80 crianças diagnosticadas com MC, com idade entre 18 meses e 4 anos, a

avaliação ocorreu uma semana após alta hospitalar e o acompanhamento durou um ano, utilizando as escalas de Mullen, os escores para este estudo foram motor fino, motor grosso, recepção visual, linguagem receptiva e linguagem expressiva, em conclusão, o estudo demonstrou que os escores foram significativamente menores em todas as áreas para crianças com MC em comparação com crianças do grupo controle.

O hipocampo é uma das principais estruturas cerebrais responsáveis pela formação da memória e pela resposta emocional, sendo suscetível a vários estressores exógenos e endógenos, mudanças em sua estrutura e função são cruciais para o desenvolvimento de transtornos do humor, visto que é também uma das principais regiões do cérebro onde o BDNF exerce sua atividade<sup>131,132</sup>. Neste estudo, as concentrações de BDNF foram avaliadas em tecido hipocampal e verificou-se que os animais induzidos a MC no período infante apresentam uma significativa redução dos níveis de BDNF na vida adulta, sendo este parâmetro revertido após a administração de imipramina durante 14 dias. O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Lim e colaboradores (2018)<sup>133</sup>, onde camundongos com comportamento depressivo induzido por dexametasona apresentaram reversão dos níveis de BDNF no hipocampo após administração de um extrato padronizado que possuía efeitos semelhantes aos antidepressivos.

Um grupo de estudos da Universidade Federal de Minas Gerais publicou dois estudos sugerindo um envolvimento dos mediadores inflamatórios nos sintomas neuropsiquiátricos encontrados em animais infectados com PbA, Miranda e colaboradores (2011; 2015)<sup>134,135</sup> demonstraram uma redução da neurogênese e um aumento significativo de apoptose no hipocampo de camundongos expostos à MC com 40 dias de idade. Tais análises foram realizadas cinco dias após o foco infeccioso, quando também identificaram a presença de declínio cognitivo e comportamento semelhante a ansiedade. Estes eventos foram associadas a uma redução significativa na expressão de mRNA do BDNF e níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em hipocampo.

Outro achado consistente neste estudo foi o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  em tecido hipocampal nos animais adultos submetidos a MC no período infante. As citocinas são conhecidas por influenciar tanto no desenvolvimento neuronal quanto a apoptose. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias podem diminuir a

proliferação celular no hipocampo e diminuir os níveis sistêmicos de BDNF, cenário este que pode influenciar negativamente a neurogênese e a neuroplasticidade e ainda favorecer o desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos<sup>136</sup>. Outra consequência dos níveis altos desta citocina no SNC é a ativação microglial persistente e a diminuição da síntese de fatores neurotróficos, como o BDNF<sup>137</sup>. Neste sentido, há um grande interesse nos efeitos das citocinas no cérebro em desenvolvimento e no comportamento a longo prazo<sup>138</sup>.

A neurogênese é um processo altamente plástico conhecido por ser influenciado por estímulos negativos como o estresse e a inflamação. No estudo de Smith e colaboradores (2013)<sup>139</sup>, a inflamação sistêmica experimental durante o período pós-natal induziu uma alteração prolongada no estado inflamatório do hipocampo. Tal resultado sugere que a administração de LPS pode reduzir a reserva de plasticidade do hipocampo e desta forma aumentar a suscetibilidade a insultos secundários e facilitar o aparecimento de patologias posteriores. A redução da neurogênese também foi observada em ratos com três semanas de idade que foram expostos a um modelo de meningite. Esta redução foi associada a baixos níveis BDNF no hipocampo, visto que após a administração exógena de BDNF foi possível observar o aumento da neurogênese na região<sup>140</sup>. De acordo com uma revisão de Castrén e Rantamaki (2009)<sup>141</sup>, é possível afirmar que pelo menos parte da fisiopatologia dos transtornos do humor possa estar associada a experiências adversas ocorridas durante o período pós-natal, podendo levar a uma reorganização desfavorável das redes corticais ao longo da vida.

Alguns estudos vêm contribuindo de forma relevante para o entendimento da etiologia e das deficiências neurocognitivas na infecção por malária. No entanto, ainda não está clara a relação entre a neuroinflamação induzida pelo *Plasmodium* e os comprometimentos neurocognitivos. Neste sentido, o estudo de Guha e colaboradores (2014)<sup>142</sup> demonstrou em um modelo animal de MC que a neurogênese poderia ser afetada pela ativação da micróglia. Da mesma forma, Reverchon e colaboradores (2017)<sup>143</sup>, revelam que após a infecção por PbA, a síntese microglial de IL-1 $\beta$  afeta a neurogênese e resulta em prejuízos cognitivos ao longo da vida, hipotetizando ainda um papel para a via da IL-1 não apenas na resposta imune que leva ao desenvolvimento da MC experimental, mas também na resposta inflamatória do SNC. Outro estudo evidenciou que camundongos com 40

dias de idade, deficientes em IL-10 e infectados com *Plasmodium chabaudi* já apresentam sintomas comportamentais e neurológicos acompanhados por um processo neuroinflamatório 14 dias após o foco infeccioso<sup>144</sup>.

Um estudo de coorte dos efeitos do TNF $\alpha$  no neurodesenvolvimento de crianças com MC foi realizado no Hospital de Mulago, entre 2008 e 2015, com crianças entre 18 meses e 12 anos de idade. Estas crianças foram avaliadas uma semana após a alta hospital e, em seguida, aos 6 e 12 meses após, utilizando Escalas de Mullen e a Bateria de Avaliação Kaufman para avaliar a habilidade cognitiva, o teste de vigilância infantil para avaliar a atenção e o modelo de Lauria para avaliar o processamento sequencial, simultâneo, capacidade de aprendizagem e de planejamento. Em conclusão, os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foram quatro vezes maiores nas crianças com MC em comparação aos controles e em crianças  $\geq 5$  anos de idade, níveis elevados de TNF- $\alpha$  no líquido cefalorraquidiano estavam associados a valores mais baixos de escore para cognição geral<sup>145</sup>.

É importante destacar que as citocinas em um estado fisiológico estão envolvidas na manutenção da integridade neuronal. Nesse sentido, os efeitos prejudiciais sob condições patológicas e o impacto na neurogênese dependem diretamente da sua concentração, visto que a principal consequência de uma desregulação dos níveis de citocinas no cérebro é a produção de moléculas inflamatórias, oxidativas e nitrosativas que podem afetar a neurogênese e a homeostase neural<sup>146,147</sup>. Um crescente corpo de evidências sugere que a ativação da resposta imune após infecção sistêmica frequentemente resulta em respostas neuroinflamatórias e, conseqüentemente, induz sintomas neuropsiquiátricos demonstrados através de estudos pré-clínicos e clínicos<sup>148,149,150</sup>. Os receptores de citocinas estão distribuídos em todo o cérebro, mas o hipocampo tem uma das maiores densidades de microglia e receptores para IL-1 $\beta$ <sup>151,152</sup>. Assim, pode-se prever que o hipocampo em desenvolvimento também pode ser particularmente vulnerável à ativação imunológica precoce.

A MC experimental em adultos caracteriza-se por edema cerebral, lesões parenquimatosas, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e redução do fluxo sanguíneo cerebral. Essas respostas fisiopatológicas estão associadas ao metabolismo cerebral prejudicado, refletindo a lesão celular e a

perturbação bioenergética<sup>153</sup>. A presença de estresse oxidativo também foi verificada em tecido cerebral<sup>154</sup>. No entanto, no que se refere ao modelo animal de MC no período infante, ainda não está claro o processo fisiopatológico. Sabe-se apenas que, estes animais apresentam alterações nos processos de aprendizado e memória associado a um aumento do tempo de imobilidade do teste de natação forçada (dados ainda não publicados). Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de lesão do sistema nervoso central na MC como um precursor necessário para o desenvolvimento de intervenções para prevenir consequente comprometimento cognitivo a longo prazo. Os dados observados neste estudo podem auxiliar neste processo visto que as consequências a longo prazo extrapolam o eixo cognitivo.

Sugere-se que os achados deste estudo podem ser devido à vulnerabilidade do encéfalo em desenvolvimento associado ao processo neuroinflamatório decorrente da MC, pois o cérebro é extremamente vulnerável ao impacto de agressões, sejam advindas do meio externo, respostas inflamatórias e comportamentais ou ainda frente a um desafio imune. Sabe-se que as citocinas desempenham um papel essencial na modelagem de sinapses, especialmente durante o desenvolvimento, portanto, qualquer interrupção no equilíbrio relativo, expressão de citocinas ou a ativação de células imunológicas durante este período crítico pode ter consequências desastrosas ao longo da vida<sup>155,156</sup>.

Por fim, utilizou-se a imipramina por 14 dias como um controle positivo no intuito de verificar se os parâmetros observados são revertidos com o uso de um antidepressivo tricíclico clássico. A reversão dos parâmetros pode evidenciar a associação entre os achados encontrados com os apresentados durante o processo fisiopatológico da depressão, visto que os resultados observados nesta pesquisa demonstram que a inflamação sistêmica no período infante alterou os parâmetros relacionados à depressão e, que essas alterações persistiram até a idade adulta. O uso de imipramina não conseguiu reverter os níveis elevados de IL-1 $\beta$ , pois o fármaco não se destina a este fim. O aumento de citocinas pró-inflamatórias deve estar relacionada a eventos primários que possivelmente levam as alterações apresentadas neste estudo.

A partir das evidências descritas neste estudo, bem como a discussão de outros autores, concluímos que um cenário neuroinflamatório no início da vida precisa ser considerado e investigado, visto que possui uma forte associação com o mecanismo fisiopatológico da depressão.

Quadro 2 – Resultados do estudo

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>RBC+PBS</b>	<b>RBC+IMIP</b>	<b>PbA+PBS</b>	<b>PbA+IMIP</b>
Preferência por sacarose	=	=	=	=
Tempo de imobilidade	↓	↓	↑	↓
Peso ponderal	=	=	=	=
Peso da glândula	↓	↓	↑	↓
Níveis de corticoesterona	↓	↓	↑	↓
Peso do hipocampo	↑	↑	↓	↑
Níveis de BDNF	↑	↑	↓	↑
Níveis de IL-1 $\beta$	↓	↓	↑	↑

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, a questão problema buscava entender se um foco infeccioso no período infante poderia desencadear parâmetros semelhantes a depressão na vida adulta de animais submetidos a MC. Com isso, concluiu-se que quando há uma exposição ao plasmódio no período infante, os animais apresentaram um comportamento relacionado à depressão quando adultos. Os principais achados deste estudo são evidenciados por meio do maior tempo de imobilidade, aumento no volume da glândula adrenal, elevado nível de corticoesterona, redução do volume do hipocampo, baixos níveis de BDNF no hipocampo e elevadas concentrações de IL-1 $\beta$  no hipocampo. Entretanto, não foi observado alterações nos peso corporal e no teste de anedonia. Vale resaltar que, os parâmetros relatados acima, foram revertidos com o uso de imipramina durante 14 dias, exceto os níveis de IL-1 $\beta$ .

Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que a neuroinflamação relacionada à MC em períodos precoces da vida, onde o SNC ainda está em desenvolvimento, pode aumentar a vulnerabilidade e estar associado a alguns parâmetros relacionados à depressão. Contudo os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem não foram estudados, sendo um fator limitante para uma análise mais acurada dos resultados obtidos.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que este estudo possa servir para futuras pesquisas, com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos na relação entre depressão e neuroinflamação, bem como fortalecer o acompanhamento de crianças com MC, e assim, reforçar a importância de intervenções precoces mais eficazes para o tratamento e prevenção desses comprometimentos.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. World malaria report 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=10D0AE673B35C0E440CD272F58708CFF?sequence=1>> Acesso em: 20 Jun. 2018.
2. World Health Organization. World malaria report 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>> Acesso em: 19 mai. 2017.
3. World Health Organization. Management of severe malaria 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241548526/en/>> Acesso em: 6 out. 2017.
4. Shikani, Henry J. et al. Cerebral Malaria. *The American Journal Of Pathology*, p.14841492, 2012.
5. Dunst, Josefine et al. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, p.1-17, 2017.
6. MC Donald, Chloë R. et al. Experimental Malaria in Pregnancy Induces Neurocognitive Injury in Uninfected Offspring via a C5a-C5a Receptor Dependent Pathway. *Plos Pathogens*, p.1-23, 2015
7. World Health Organization. Depression: let's talk. *Mental Disorders Fact Sheet Online 2017*. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/world-health-day/en/>> Acesso em: 6 out. 2017.
8. MÉNARD, Caroline; HODES, Georgia E.; RUSSO, Scott J.. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, p.138162, 2016.
9. LIMA-OJEDA, Juan M.; RUPPRECHT, Rainer; BAGHAI, Thomas C.. Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. *The World Journal Of Biological Psychiatry*, p.1-11, 2017.
10. KHANDAKER, Golam M.; DANTZER, Robert. Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia? *Psychopharmacology (berl)*, p.15591573, 2016.
11. BRITES, Dora; FERNANDES, Adelaide. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, p.1-20, 2015.
12. Organização Mundial da Saúde. Doenças Tropicais Negligenciadas: 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro\\_relatorio\\_oms\\_doencas\\_tropicais.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro_relatorio_oms_doencas_tropicais.pdf)> Acesso em 20 mar. 2017.

13. Scott, Kate M. et al. Childhood maltreatment and DSM-IV adult mental disorders: comparison of prospective and retrospective findings. *The British Journal Of Psychiatry*, p.469-475, 2012.
14. Varese, Filippo et al. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia Bulletin*, p.661-671, 2017.
15. Kessler, Ronald C. et al. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *O British Journal Of Psychiatry*, p.378-385, 2010.
16. Hasegawa, Miriam Yuri et al. Comparação entre os Métodos da gota espessa e reação em cadeia de polimerase (PCR) para Diagnóstico da Malária. *Science In Health*, p.152-156, 2014.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_epidemiologico\\_numero\\_1\\_2013.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epidemiologico_numero_1_2013.pdf)> Acesso em 20 mar. 2017.
18. World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030: 2015. Disponível em <[http://www.who.int/malaria/areas/global\\_technical\\_strategy/en/](http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/en/)> Acesso em 20 mar. 2017.
19. Bhatt, S. et al. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature*, p.1-17, 2016.
20. Kazembe, T.; Munyarari, E.; Charumbira, I. Use of Traditional Herbal Medicines to Cure Malaria. *Bulletin Of Environment, Pharmacology And Life Sciences*, p.63-85, 2012.
21. Phillips, Margaret et al. Malaria. *Nature Reviews*, p.1-24, 2017.
22. Castro, Marcia C.. Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine Journal*, p.1-13, 2017.
23. Yamana, Teresa K.; Eltahir, Elfatih A.b.. Projected Impacts of Climate Change on Environmental Suitability for Malaria Transmission in West Africa. *Environmental Health Perspectives*, p.1179-1186, 2013.
24. Mordecai, Erin A. et al. Optimal temperature for malaria transmission is dramatically lower than previously predicted. *Ecology Letters*, p.22-30, 2013.
25. Fontes, Cor Jesus Fernandes et al. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Ministério da Saúde, p.1-38, 2010. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2017.
26. Gülaşđ, Selvi; Özdener, Nureddin. Congenital malaria: Importance of diagnosis and treatment in pregnancy. *The Turkish Journal Of Pediatrics*, p.195-199, 2016.

27. Bhatia, Ravi et al. Congenital Malaria due to Plasmodium Vivax Infection in a Neonate. *Case Reports In Pediatrics*, p.1-2, 2016.
28. Sharma, Lalita; SHUKLA, Geeta. Placental Malaria: A new insight into the Pathophysiology. *Frontiers In Medicine*, p.1-6, 2017.
29. Marques, Agostinho Cruz et al. *Manual de Terapêutica da Malária*. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde., 2001. 104 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu\\_terapeutica\\_malaria.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_terapeutica_malaria.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2017.
30. SINGH, Veer Bahadur et al. Neuropsychiatric Profile in Malaria: An Overview. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research.*, p.24-28, 2016.
31. Miranda, Aline Silva. Sintomas neurológicos agudos e residuais na malária. *Revista Brasileira de Neurologia*, p.35-41, 2010.
32. World Health Organization. World malaria report 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report2015/report/en/>> Acesso em: 19 mai. 2017.
33. Thonsranoi, Klairoong et al. Increased synapsin I expression in cerebral malaria. *International Journal Of Clinical And Experimental Pathology*, p.13996 - 14004, 2015.
34. Idro, Richard et al. Cerebral Malaria; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies For Improved Neuro-Cognitive Outcome. *Pediatric Research*, p.267-274, 2010.
35. Boivin, Michael J. et al. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. *Pediatrics*, p.360-366, 2007.
36. Kihara, Michael et al. Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. *MalariaJournal*, p.1-8, 2009.
37. Reiss, Allan L. et al. Brain development, gender and IQ in children. A volumetric imaging study. *Brain*, p.1763-1774, 1996.
38. Hawkes, Michael et al. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier. *Virulence*, p.543-555, 2013.
39. Reis, Patricia A. et al. Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria. *Plos Pathogens*, p.1-13, 2012.
40. Rees, Sandra; Harding, Richard; Walker, David. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *International Journal Of Developmental Neuroscience*, p.551-563, 2011.
41. Fernando, Sumadhya D; Rodrigo, Chaturaka; Rajapakse, Senaka. The 'hidden' burden of malaria: cognitive impairment following infection. *MalariaJournal*, p.1-11, 2010.

42. Comim, Clarissa M. et al. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity in the hippocampus of survivor mice. *Neuroscience Letters*, p.104-107, 2012.
43. Reis, Patricia A. et al. Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy. *Plos Pathogens*, p.1-16, 2010.
44. Mac Cormick, Ian J. C. et al. Cerebral malaria in children: using the retina to study the brain. *Brain*, p.2119-2142, 2014
45. Seydel, Karl B. et al. Brain Swelling and Death in Children with Cerebral Malaria. *The New England Journal Of Medicine*, p.1126-1137, 2015.
46. Dorovini-Zis, Katerina et al. The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children. *The American Journal Of Pathology*, -, p.2146-2158, 2011.
47. Storm, Janet; Craig, Alister G.. Pathogenesis of cerebral malaria— inflammation and cytoadherence. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, p.1-8, 2014.
48. Daneman, Richard et al. The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A New Resource for Understanding the Development and Function of Brain. Endothelial Cells. *Plos One*, p.1-16, 2010.
49. Tohidpour, Abolghasem et al. Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, p.1-17, 2017.
50. Page, Andrea V; Liles, W Conrad. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*, p.507-516, 2013.
51. Ransohoff, Richard M.; Brown, Melissa A.. Innate immunity in the central nervous system. *Journal Of Clinical Investigation*, p.1164-1171, 2012.
52. Schafera, Dorothy P; Stevensa, Beth. Phagocytic Glial Cells: Sculpting Synaptic Circuits in the Developing Nervous System. *Current Opinion In Neurobiology*, p.1-14, 2013.
53. Bilbo, Staci D.; Schwarz, Jaclyn M.. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, p.1-14, 2009.
54. Norden, Diana M.; Godbout, Jonathan P.. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. *Neuropathology And Applied Neurobiology*, p.1-20, 2013.
55. John, Chandy C. et al. Cerebral Malaria in Children Is Associated With Longterm Cognitive Impairment. *Pediatrics*, p.1-16, 2008.
56. Steinberg, Holger; Himmerich, Hubertus; Scheiderer, David J.. Emil Kraepelin's habilitation and his thesis: A pioneer work for modern systematic reviews, psychoimmunological research and categories of psychiatric diseases. *The World Journal Of Biological Psychiatry*, p.248-257, 2013

57. Rantakallio, Paula; Von Wendt, Lennart. Association between central nervous system infections during childhood and adult onset schizophrenia and other psychoses: a 28-year follow-up. *International Journal Of Epidemiology*, p.837-843, 1997.
58. Calcia, Marilia A. et al. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*, p.1637-1650, 2016.
59. Guh, Suman K. et al.. Single episode of mild murine malaria induces neuroinflammation, alters microglial profile, impairs adult neurogenesis, and causes deficits in social and anxiety-like behavior. *Brain, Behavior, And Immunity*, p.1-15, 2014.
60. Idro, Richard et al.. Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort. *Malaria Journal*, p.184-195, 2016.
61. Liao, Yin-to et al.. Association between depression and enterovirus infection: A nationwide population-based cohort study. *Medicine*, p.1-7, 2017.
62. Dantzer, Robert et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience.*, p.124, 2008.
63. Feltes, Paula Kopschina et al. Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. *Journal Of Psychopharmacology*, p.1149-1165, 2017.
64. Yoshimura, Reiji et al. Serum proBDNF/BDNF and response to fluvoxamine in drug-naïve first-episode major depressive disorder patients. *Annals Of General Psychiatry*, p.13-20, 2014.
65. Mathers, Colin D; Loncar, Dejan.. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *Plos Medicine*, p.2011-2030, 2006.
66. Organização Mundial da Saúde. Relatório Mundial: Saúde Mental 2002. Disponível em: <[http://www.who.int/whr/2001/en/whr01\\_djmessage\\_po.pdf](http://www.who.int/whr/2001/en/whr01_djmessage_po.pdf)> Acesso em 27 mai. 2017.
67. World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2eng.pdf?ua=1>> Acesso em 1 jun. 2017.
68. Wardenaar, Klaas J; Jonge, Peter de.. Diagnostic heterogeneity in psychiatry: towards an empirical solution. *BMC Medicine*, p.1-3, 2013.
69. Quevedo J, Silva AG. Depressão: teoria e clínica. Porto Alegre: Artmed, 2013.
70. Macqueen, Glenda M. et al. Posterior hippocampal volumes are associated with remission rates in patients with major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, p.880-883, 2008.

71. Peacock, Brandon N.; Kellermann, Gottfried H.; Scheiderer, David J.. Biomolecular aspects of depression: A retrospective analysis. *Comprehensive Psychiatry*, p.168-180, 2017.
72. Juruena, Mario F; Clearea, Anthony J; Pariante, Carmine M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, p.189-201, 2004.
73. Raison, Charles L.; Miller, Andrew H.. Is Depression an Inflammatory Disorder. *Current Psychiatry Reports*, p.467-475, 2011.
74. Schmidt, Heath D; Shelton, Richard C; Duman, Ronald S. Functional Biomarkers of Depression: Diagnosis, Treatment, and Pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*, p.2375-2394, 2011.
75. Martinac, Marko et al. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inflammatory mediators in major depressive disorder with or without metabolic syndrome. *Psychiatria Danubina*, p.39-50, 2017.
76. Smith, Ronald. The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*, p.298-306, 1991.
77. Maes, Michael; Smith, Ronald; Scharpe, Simon. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology*, p.111-116, 1995.
78. Raison, Charles L.; Capuron, Lucile; Miller, Andrew H.. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends In Immunology Journals*, p.1-15, 2006.
79. Cusker, Robert H. Mc; Kelley, Keith W.. Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *Journal Of Experimental Biology*, p.84-98, 2013.
80. Murínová, Jana et al. The Evidence for Altered BDNF Expression in the Brain of Rats Reared or Housed in Social Isolation: A Systematic Review. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, p.1-10, 2017.
81. Duman, Ronald S.; Monteggia, Lisa M.. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, -, p.1116-1127, 2006.
82. Numakawa, Tadahiro et al. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. *International Journal Of Molecular Sciences*, p.11-18, 2017.
83. Balaratnasingam, Sivasankaran; Janca, Aleksandar. Brain Derived Neurotrophic Factor: A novel neurotrophin involved in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, p.116-124, 2012.
84. Li, Ching et al. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Medical Microbiology And Immunology*, p.115-126, 2001.

85. Lacerda-Queiroz, Norinne; Teixeira, Mauro Martins; Teixeira, Antônio Lúcio. Imunopatogênese da malária cerebral. *Revista Brasileira de Neurologia*, p.1319, 2008.
86. Lou, Jinning; Lucas, Ralf; Grau, Georges E. Pathogenesis of Cerebral Malaria: Recent Experimental Data and Possible Applications for Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, p.810-820, 2001.
87. Ministério da Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos. Brasília, 2006.
88. Monleon, Santiago et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, p.453-457, 1995.
89. Nunes, Emerson Arcoverde; HALLAK, Jaime Eduardo Cecílio. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, p.528-543, 2014.
90. Funchal, Cláudia; Dani, Caroline. *Neurociências: modelos experimentais em animais*. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2014.
91. Comim, Clarissa M. et al. Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats. *Neurotoxicity Research*, p.279-286, 2010.
92. American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 992 p.
93. Burstein, Or et al. Escitalopram and NHT normalized stress-induced anhedonia and molecular neuroadaptations in a mouse model of depression. *Plos One*, p.1-14, 2017
94. Zhu, Wei et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide. *Neuroscience*, p.77-84, 2017.
95. Comim, Clarissa M. et al. Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats. *Neurotoxicity Research*, p.279-286, 2010.
96. Allaert, François-andré et al. A randomized controlled double-blind clinical trial comparing versus placebo the effect of an edible algal extract (*Ulva Lactuca*) on the component of depression in healthy volunteers with anhedonia. *BMC Psychiatry*, p.1-10, 2018.
97. Tolentino, Julio; SCHMIDT, Sergio. DSM-5 Criteria and Depression Severity: Implications for Clinical Practice. *Frontiers In Psychiatry*, p.1-9, 2018.
98. Chadman, Kathryn K. et al. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. *American Journal Of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric*, p.1-11, 2009.
99. Zhao, Jing et al. The depressive-like behaviors of chronic unpredictable mild stress-treated mice, ameliorated by Tibetan medicine Zuotai: involvement in

- the hypothalamic–pituitary– adrenal (HPA) axis pathway. *Neuropsychiatric Disease And Treatment*, p.124-141, 2018.
100. Comim, Clarissa Martinelli et al. Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. *Molecular Neurobiology*, p.5928-5934, 2016.
  101. Liu, Shuiqiao et al. BICAO-induced ischaemia caused depressive-like behaviours and caspase8/-9-dependent brain regional neural cell apoptosis in mice. *Stroke And Vascular Neurology*, p.1-8, 2018.
  102. Reis, Patricia et al. Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy. *Plos Pathogens*, p.1-16, 2010.
  103. Ssenkusu, John Mbaziira et al. Long-term Behavioral Problems in Children With Severe Malaria. *Pediatrics*, p.1-9, 2016.
  104. Peixoto, Helicinia Giordana Espíndola et al. Antidepressivos e alterações no peso corporal. *Revista de Nutrição*, p.341-348, 2008.
  105. Wit, Leonore M de et al. Depression and body mass index, a u-shaped association. *BMC Public Health*, p.9-14, 2009.
  106. Kim, Jinseok et al. Body Mass Index and Depressive Symptoms in Older Adults: A Cross-Lagged Panel Analysis. *Plos One*, p.1-9, 2014.
  107. Hajek, André; KÖNIG, Hans-helmut. Are changes in body-mass-index associated with changes in depressive symptoms? Findings of a population-based longitudinal study among older Germans. *BMC Psychiatry*, p.1-10, 2018.
  108. Forman-HOFFMAN, Valerie et al. Weight and depressive symptoms in older adults: direction of influence? *Journal Of Gerontology- Psychological Sciences*, p.43-51, 2009.
  109. Raposo, José Vasconcelos et al. Relação entre exercício físico, depressão e índice de massa corporal. *Motricidade*, p.21-32, 2009.
  110. Lawson, Marcus et al. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. *Journal Of Neuroinflammation*, p.1-12, 2013.
  111. Van BODEGOM, Miranda et al. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. p.1-33, 2017.
  112. Bilbo, Staci D.; SCHWARZ, Jaclyn M.. The Immune System and Developmental Programming of Brain and Behavior. *Frontiers In Neuroendocrinology*, p.267-286, 2012.
  113. Di, Tingting et al. Hyperactivity of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Due to Dysfunction of the Hypothalamic Glucocorticoid Receptor in Sigma-1 Receptor Knockout Mice. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, p.1-14, 2017.

114. Sandi, Carmen; HALLER, József. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, p.290-304, 2015.
115. Faravelli, Carlo et al. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. *World Journal Of Psychiatry*, p.13-25, 2012.
116. Davis, Timothy et al. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis in Severe Falciparum Malaria: Effects of Cytokines. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, p.1-20, 1997.
117. Doosti, Mohammad-Hossein et al. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Progress In Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, p.55-65, 2013.
118. Marzzani, Simone Helena Schelder. Parâmetros relacionados à depressão em animais adultos submetidos à ativação imune neonatal. 2018. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, 2018
119. Wilkinson, Samuel T. et al. Hippocampal volume changes following electroconvulsive therapy: a systematic review and meta-analysis. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience And Neuroimaging*, p.327-335, 2017.
120. Slavich, George M.; IRWIN, Michael R.. From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression. *Psychological Bulletin*, p.774-815, 2014.
121. Kinnon, Margaret C. Mc et al. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *Journal Of Psychiatry & Neuroscience*, p.41-54, 2009.
122. Musaelyan, Ksenia et al. Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis by Early-Life Environmental Challenges Triggering Immune Activation. *Neural Plasticity*, p.1-10, 2014.
123. Van BOKHOVEN, P. et al. Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment. *European Journal Of Neuroscience*, p.1833-1840, 2011.
124. Ramirez, Karol et al. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. *Brain, Behavior And Immunity*, p.212-220, 2015.
125. Calabrese, Francesca et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, p.1-7, 2014.
126. Assis, Gilmara G. de et al. Brain derived neurotrophic factor, a link of aerobic metabolism to neuroplasticity. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, p.351-358, 2018.

127. Popova, N K et al. REVIEW: Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry*, p.449-459, 2017.
128. Molendijk, Marc et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N = 9484). *Molecular Psychiatry*, p.791-800, 2014.
129. Comim, Clarissa et al. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity [correction for activity] in the hippocampus of survivor mice. *Neuroscience Letters*, p.104-107, 2012.
130. Bangirana, Paul et al. Neurocognitive domains affected by cerebral malaria and severe malarial anemia in children. *Learning And Individual Differences*, p.38-44, 2016.
131. Zaletel, Ivan et al. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Reviews In The Neurosciences*, p.675-692, 2017.
132. Castréna, Eero; KOJIMA, Masami. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiology Of Disease*, p.119-126, 2017.
133. Lim, Dong Wook et al. Standardized Citrus unshiu peel extract ameliorates dexamethasone-induced neurotoxicity and depressive-like behaviors in mice. *Metabolic Brain Disease*, p.1-10, 2018.
134. Miranda, Aline Silva de et al. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). *Neuroscience Letters*, p.202-206, 2011.
135. Miranda, Aline Silva de. Evidence for the contribution of adult neurogenesis and hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome. *Neuroscience*, p.920-933, 2015.
136. Felger, Jennifer C.; LOTRICH, Francis E.. Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms and Therapeutic Implications. *Neuroscience*, p.199-229, 2013.
137. Audet, Marie-claude; ANISMAN, Hymie. Interplay between pro-inflammatory cytokines and growth factors in depressive illnesses. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, p.1-19, 2013.
138. Haapakoski, Rita et al. Innate and adaptive immunity in the development of depression: An update on current knowledge and technological advances. *Progress In Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, p.63-72, 2016.
139. Smith, Peter L.p. et al. Neonatal Peripheral Immune Challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. *Developmental Neuroscience*, p.119-131, 2013.

140. Lian, di et al. Exogenous BDNF increases neurogenesis in the hippocampus in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal Of Neuroimmunology*, p.46-55, 2016.
141. Castrén, Eero; RANTAMAKI, Tomi. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental Neurobiology*, p.289-297, 2010.
142. Guha, Suman et al. Single episode of mild murine malaria induces neuroinflammation, alters microglial profile, impairs adult neurogenesis, and causes deficits in social and anxiety-like behavior. *Brain, Behavior, And Immunity*, p.123-137, 2014.
143. Reverchon, Flora et al. IL-33 receptor ST2 regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria. *Plos Pathogens*, p.1-25, 2017.
144. Wilson, Kyle et al. Behavioural and neurological symptoms accompanied by cellular neuroinflammation in IL-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Malaria Journal*, p.1-12, 2016. (WILSON et al., 2016).
145. Shabani, Estela. Elevated cerebrospinal fluid tumor necrosis factor is associated with acute and long-term neurocognitive impairment in cerebral malaria. *Parasite Immunology*, p.1-20, 2017.
146. Stepanichev, Mikhail et al. Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. *Biomed Research International*, p.1-20, 2014.
147. Mendiola, Andrew S.; CARDONA, Astrid E.. The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal Of Neural Transmission*, p.781-795, 2018.
148. Noter, T et al. Translational evaluation of translocator protein as a marker of neuroinflammation in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, p.323-334, 2018.
149. Isgren, Anniella et al. Markers of neuroinflammation and neuronal injury in bipolar disorder: Relation to prospective clinical outcomes. *Brain, Behavior And Immunity*, p.195-201, 2017.
150. Guo, J. et al. Etazolate abrogates the lipopolysaccharide (LPS)-induced downregulation of the cAMP/pCREB/BDNF signaling, neuroinflammatory response and depressive-like behavior in mice. *Neuroscience*, p.1-14, 2014.
151. Schneider, H. et al. A neuromodulatory role of interleukin-1b in the hippocampus. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, p.7778-7783, 1998.
152. Alvarez-CRODA, Dulce-mariely et al. Hippocampal distribution of IL-1 $\beta$  and IL-1RI following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in the developing rat. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, p.653-663, 2016.

153. Reis, Patricia A. et al. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *Plos Pathogens*, p.1-13, 2012.
154. Penet, Marie-france et al. Imaging Experimental Cerebral Malaria In Vivo: Significant Role of Ischemic Brain Edema. *Neurobiology Of Disease*, p.7352-358, 2005.
155. Raison, Charles L.; MILLER, Andrew H.. Malaise, Melancholia and Madness: The Evolutionary Legacy of an Inflammatory Bias. *Brain, Behavior And Immunity*, p.1-8, 2013.
156. Cunningham, Christopher L. et al. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal Of Neuroscience*, p.4216-4233, 2013.

**ANEXO**

## ANEXO A – Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 11 de abril de 2018  
Registro na CEUA (código): 18.001.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Comim Cassol

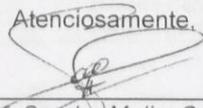
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliações dos parâmetros relacionados a depressão em animais adultos submetidos a malária cerebral no período infantil", registrada com o nº 18.001.4.01.IV.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Comim Cassol - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 10 de abril de 2018.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão