

Características histopatológicas de malaria cerebral en la infección de ratones C57BL/6/Cenp con *Plasmodium berghei* Anka

Histopathological characteristics of cerebral malaria in C57BL/6/Cenp mice infected with *Plasmodium berghei* Anka

Judith Mendiola Martínez,^I Mario Enrique García Rodríguez,^{II} Virginia Capó de Paz,^{III} Julio César Ancízar Fragoso,^{IV} Jenny Peraza Bordo,^{III} Aymé Fernández-Calienes Valdés,^I Bárbara González Navarro^{IV}

^I Departamento de Parasitología. Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia (CIDR). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Bioterio. CIDR. IPK. La Habana, Cuba.

^{III} Departamento de Anatomía Patológica. Centro Hospitalario. IPK. La Habana, Cuba.

^{IV} Departamento de Anatomía Patológica. Bioterio. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la malaria cerebral es una de las complicaciones más importantes de la infección con *Plasmodium falciparum*. Ante el reto del esclarecimiento de su fisiopatología, los modelos murinos han sido de gran utilidad. Sin embargo, se presentan hallazgos histopatológicos contradictorios en el modelo de ratones C57BL/6 infectados con *Plasmodium berghei* Anka debido a la utilización de diferentes protocolos y líneas de ratones.

Objetivos: identificar los principales signos clínicos de la malaria cerebral en ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka y describir las afectaciones histopatológicas en tejidos encefálicos.

Métodos: cuarenta y siete ratones hembras de esta sublínea fueron infectadas y 10 constituyeron el grupo control. A partir del día 5 posterior a la infección se realizaron las observaciones conductuales y de signos clínicos descritos para este modelo. Se seleccionaron 5 ratones hembras con signos neurológicos y 4 controles;

se les aplicó punto final humanitario y rápidamente se extrajeron los encéfalos que se conservaron en formalina al 10 %; se procesaron en parafina y los cortes coronales de 5 µm se colorearon con hematoxilina-eosina y se compararon.

Resultados: los principales signos neurológicos observados en los animales parasitados fueron la ataxia, las convulsiones y la parálisis en cuello y extremidades posteriores. Los encéfalos del grupo control no presentaron afectaciones, a diferencia de las muestras correspondientes a ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka, con signos neurológicos que mostraron microhemorragias como principal hallazgo histológico.

Conclusiones: las descripciones de signos clínicos e histopatológicas confirmaron la presencia de daño encefálico en esta infección experimental, lo cual fundamenta un acercamiento a la malaria cerebral humana.

Palabras clave: malaria cerebral; *Plasmodium berghei* Anka; C57BL/6/Cenp; histopatología.

ABSTRACT

Introduction: cerebral malaria is one of the most important complications of infection with *Plasmodium falciparum*. Murine models have been very useful to meet the challenge of defining the physiopathology of this condition. However, contradictory histopathological results have been found in the model for C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* Anka, due to the use of different protocols and mice strains.

Objectives: identify the main clinical signs of cerebral malaria in C57BL/6/Cenp mice infected with *P. berghei* Anka and describe the histopathological damage to brain tissue.

Methods: forty-seven female mice from this substrain were infected, while another 10 were used as control group. Observation of the behavior and clinical signs described for the model was conducted as of day 5 after infection. Five female mice with neurological signs and four controls were selected. They were applied humane endpoint, and their brains were quickly extracted, preserved in 10 % formalin and processed with paraffin. The 5 µm coronal sections were stained with haematoxylin-eosin and compared.

Results: the main neurological signs observed in the infected animals were ataxia, convulsions, and neck and hind limb paralysis. No damage was observed in brains from the control group, unlike the samples from C57BL/6/Cenp mice infected with *P. berghei* Anka with neurological signs, where microhemorrhage was the main histological finding.

Conclusions: clinical signs and histopathological results confirmed the presence of brain damage caused by the experimental infection under study, substantiating a relationship to human cerebral malaria.

Key words: cerebral malaria; *Plasmodium berghei* Anka; C57BL/6/Cenp; histopathology.

INTRODUCCIÓN

Entre las complicaciones de mayor peligro para la vida que ocurren durante una infección con *Plasmodium falciparum* se encuentra la malaria cerebral (MC).^{1,2} Es necesario comprender los procesos fisiopatológicos de la MC para poder desarrollar medidas preventivas, métodos diagnósticos y terapias complementarias. Sin embargo, aún se presentan grandes retos en el esclarecimiento de los eventos sistémicos y locales determinantes.³

La infección de ratones C57BL/6 con *Plasmodium berghei* Anka proporciona un modelo experimental de la malaria cerebral (MCE) que ha sido un instrumento muy generalizado y provechoso.⁴ En este modelo murino se describe variabilidad en la incidencia, la expresión y el momento de comienzo de las manifestaciones neurológicas debido a diferentes factores de la relación hospedero-parásito. Las condiciones genéticas de los animales de acuerdo con el suministrador, la edad de los animales, su dieta y la heterogeneidad interindividual se refieren como factores claves.⁵ También modulan la ocurrencia de MCE: la dosis del inóculo, el curso de la parasitemia y las variaciones clonales del parásito.⁵

Varias sublíneas de ratones C57BL/6 han mostrado diferencias fenotípicas. Un ejemplo de ello es que se determinaron diferencias en el perfil de expresión de proteínas de varias regiones encefálicas de ratones C57BL/6/J y C57BL/6/NCrI.⁶ Otro aspecto en que se reconoce la contribución de las diferencias genéticas del hospedero es en la inmunomodulación, por lo que en estudios relacionados con la malaria severa, la descripción del origen y el fondo genético de los animales incorporados como modelos es esencial.⁷ La presentación de signos clínicos de la malaria cerebral en ratones C57BL/6/Cenp⁸ infectados con *P. berghei* Anka puede presentar variabilidad basada en que estas crías y sus progenitores se han mantenido separados por un largo tiempo, en ambientes diferentes,⁹ aunque no se han comprobado diferencias genéticas.

En los encéfalos de ratones infectados con *P. berghei* Anka que muestran signos de MCE se identifican múltiples áreas de ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) con escape del contenido vascular; evidenciado principalmente por la presencia de microhemorragias (MH)¹⁰⁻¹² y edema.^{10,13} La adherencia y acumulación vascular de monocitos y macrófagos se considera también un elemento clave de la MCE,^{10,14} así como la activación de células mononucleares residentes como los astrocitos y las células microgliales.¹⁵ Además, se describe la pérdida de poblaciones neuronales específicas en la corteza y el cuerpo estriado.^{15,16} Sin embargo, se han realizado observaciones que describen MH relativamente escasas y no existen alteraciones obvias mediante técnicas histopatológicas que expliquen la amplia ruptura de la BHE,¹⁷ mientras otras mostraron que la magnitud de la acumulación y adherencia de leucocitos fue heterogénea en los diferentes individuos.^{16,18} Adicionalmente, no se observa regularidad en relación con la descripción de edema en diferentes investigaciones.^{12,14,18} Estos hallazgos contradictorios pueden deberse a los factores mencionados previamente y a la ausencia de un protocolo universal para realizar estos estudios.¹⁷ La preparación previa de los animales se ha realizado a través de diferentes alternativas de punto final humanitario (PFH) entre las que ha predominado la aplicación de diferentes anestésicos^{11,14,18} y en algunos casos, es seguida de perfusión intracardiaca con diferentes soluciones fisiológicas y fijadoras.^{13,14}

Estas variables determinaron la necesidad de realizar este trabajo con el objetivo de identificar la presentación de signos clínicos de la malaria cerebral en ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka en los laboratorios de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) y describir las principales afectaciones histopatológicas en tejidos encefálicos con la perspectiva de la implementación de este modelo para investigaciones acerca de nuevas alternativas terapéuticas.

MÉTODOS

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con la Resolución 11-2013 del Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED)¹⁹ y el protocolo de investigación CEI-IPK 47-12. Se emplearon 57 ratones hembras C57BL/6/Cenp de 6 a 8 semanas de edad y peso entre 15 y 18 g que fueron suministrados por el CENPALAB. Estos animales se adaptaron a su nuevo ambiente por más de 3 días antes de comenzar los experimentos. Los ratones se colocaron en jaulas en grupos de 5-6 animales, que fueron identificados²⁰ y se mantuvieron con acceso libre al agua y los alimentos, periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, temperatura de 25 °C y humedad relativa del 70 %. Cuarenta y siete fueron infectados y 10 formaron parte del grupo control.

La cepa de *P. berghei* Anka (procedente del Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene de la Universidad de Amberes, Bélgica) se propagó por pases sucesivos de eritrocitos parasitados a ratones C57BL/6/Cenp. En cada experimento, una suspensión de glóbulos que contenía $1-2 \times 10^5$ parásitos en 0,1 mL se inoculó mediante inyección intraperitoneal en cada ratón.¹⁰ En el grupo control, los ratones se mantuvieron en condiciones similares al grupo de infectados.

A partir del día 5 posterior a la infección se realizaron las observaciones que se describen en el cuadro, según los procedimientos referidos por Lackner y otros,¹⁶ una vez al día, en horario de la mañana, por tres observadores. Las categorías de las observaciones se definieron previamente.^{21,22} El PFH se definió para la presentación de inmovilidad, dificultad respiratoria, afectaciones neurológicas (parálisis, convulsiones). Para la curva de supervivencia se consideraron igualmente las muertes espontáneas y la aplicación de PFH. El perfil de supervivencia de los animales infectados se evaluó mediante curvas de Kaplan-Meier. Se empleó el programa estadístico GraphPad Prism (versión 5.0 para Windows, GraphPad softwares Inc, EE UU).

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

Cuadro. Observaciones de la conducta y signos clínicos que se evaluaron en relación con la presentación de enfermedad severa y afectaciones neurológicas durante la infección de C57BL/6/Cenp con *P. berghei* Anka

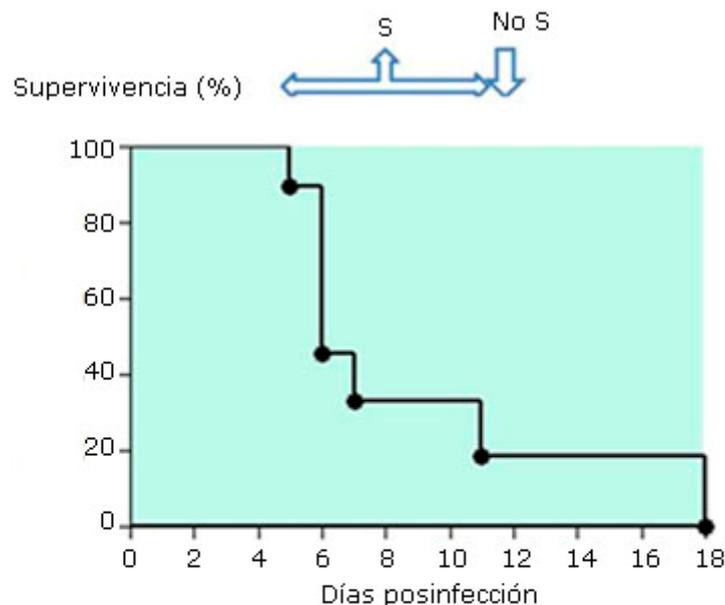
Observaciones	Categorías
1. Desplazamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Desplazamiento fluido • Carencia de fluidez en el movimiento • No se desplaza
2. Posición del cuerpo	<ul style="list-style-type: none"> • Saltos verticales repetidos • Apoyado sobre las patas traseras • Sentado o parado • Encorvado • Descansa de bruces • Descansa de lado • Cuerpo completamente plano
3. Parálisis parcial	<ul style="list-style-type: none"> • Ausente • Presente (en extremidades posteriores y cuello)
4. Respiración	<ul style="list-style-type: none"> • Normal • Ritmo rápido • Ritmo lento • Irregular
5. Tremor	<ul style="list-style-type: none"> • Ninguno • Moderado • Marcado
6. Convulsiones ²¹	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Tipo clónico:</i> Se presentan sacudidas repetidas de un músculo o grupo de músculos (alternando contracción y relajación). Puede afectar rostro, cabeza, mandíbula, una o ambas extremidades anteriores. Se produce pérdida de la postura normal, <i>clonus</i> de las cuatro extremidades o el animal se levanta sobre los miembros posteriores, corre rápido y/o salta abruptamente • <i>Tipo tónico:</i> Se observa la extensión sostenida de los miembros traseros, antecedida de una flexión tónica. Algunas enfermedades se caracterizan por la presencia de opistótono (cabeza, tronco y extremidades están arqueados para atrás rígidamente) y emprostótono (lo opuesto, rígidamente encogidos) • <i>Tipo mixto:</i> Se muestra una contracción sostenida inicial de los músculos, la cual es seguida de contracciones musculares rítmicas
7. Comportamiento estereotipado	<ul style="list-style-type: none"> • Movimientos de cabeza • Mordida o lambida compulsivas • Mordida autodestructiva, otros

Para el análisis de las MH se utilizó el método semicuantitativo descrito previamente por Dai y otros,¹¹ basado en una escala de 0 a 4: 0= los glóbulos rojos están confinados dentro de los vasos, 1= se observa un vaso con una extravasación mínima de glóbulos rojos en un campo analizado con objetivo 10X; 2= más de un vaso con extravasación mínima en un campo microscópico, 3= un vaso con extravasación extensa en un campo; 4= más de un vaso con extensa extravasación en un campo. La presencia de MH se describió como un conjunto bien circunscrito de 10-100 glóbulos rojos en el parénquima, no confinados a un vaso sanguíneo. El daño vascular se verificó por observación con objetivo 40X. Cuatro especialistas en Anatomía Patológica que desconocían la identidad de las muestras revisaron las

láminas. En cada muestra se describieron el total de MH observadas de todos los campos 10X, su magnitud y localización.

RESULTADOS

Las condiciones físicas de los ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka se deterioraron entre los días 6 y 11 posinfección; se produjeron muertes espontáneas de los animales y se aplicó PFH según los criterios acordados para su aplicación urgente. En este periodo 81,2 % del total de infectados no sobrevivieron. Estos animales se consideraron con enfermedad severa (grupo S). La mediana de supervivencia fue 6 días (Fig. 1). La observación de signos severos se correspondió con la aplicación del PFH para 52,6 % del total de animales. Los ratones en que se aplicó PFH por la observación de signos severos mostraron afectaciones neurológicas (dificultad en la marcha, parálisis de las extremidades posteriores y de la región del cuello y convulsiones) en 40 % de los casos y respiración anormal (taquipnea) en 65 %. Las convulsiones se mostraron en diferentes formas de los tipos clónico, tónico y mixto. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de opistótono, emprostótono o bruxismo. No se observó comportamiento estereotipado. Un 18,7 % de los ratones infectados no presentaron signos neurológicos entre los días 6 y 11 y mantuvieron la supervivencia después del día 12 posinfección (grupo No S) (Fig. 1).



El perfil de los animales con enfermedad severa entre los días 6 y 11 posinfección se indica como grupo S. El grupo de infectados que mantuvieron la supervivencia después del día 12 posinfección sin la observación de afectaciones neurológicas se representa con No S. En este se observó deterioro del bienestar animal que condujo a la aplicación de PFH el día 18.

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

Todos los encéfalos analizados de ratones C57BL/6/Cenp sanos no presentaron alteraciones de su histomorfología; solamente se encontraron algunos artefactos de edema vascular debido al no empleo de la técnica de perfusión al sacrificio (Fig. 2, A).

El principal hallazgo histológico en las muestras de encéfalos de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka que presentaron signos neurológicos fueron las MH. Generalmente, no se observaron diferencias macroscópicas distintivas en las muestras de encéfalos de animales del grupo S y del grupo control. La figura 2, B muestra una de las tres MH de puntuación 1, detectadas en la muestra 2; dos se localizaron en corteza y otra en sustancia blanca cercana a los ventrículos laterales. La figura 2, C muestra una MH extensa y difusa observada en la muestra 3, la cual presentó además una MH de puntuación 1; ambas en la sustancia blanca, en el hipocampo cercano a los ventrículos laterales. La figura 2, D exhibe la presencia de una extravasación extensa de eritrocitos de puntuación 3 en la muestra 4, correspondiente a un total de 4 MH que se localizaron en su mayoría en el cerebelo y además en hipocampo. En las figuras 2, E y 2, F (señalada con a) se presentan individualmente MH extensas (puntuación 3) de un total de tres registradas para la muestra 5; dos de ellas aparecieron vecinas en la corteza y la otra en meninges. Además, en la figura 2, F (b) se observaron vasos congestionados con glóbulos rojos y leucocitos. En la figura 2, G, se presentaron alteraciones hísticas y también acumulación vascular de células inflamatorias en la región del cuerpo calloso de la muestra 2 de animales del grupo S. En general, la mayoría de los encéfalos mostraron congestión vascular, con la presencia notable de infiltrados de células inflamatorias, tanto en vasos en sustancia blanca como gris y en meninges. En el caso de la muestra 1(S), este fue el hallazgo fundamental, en ausencia de MH. Se observaron otras diferencias en la apariencia histomorfológica entre encéfalos de animales del grupo S (ejemplo de la muestra 2, Fig. 2, G) y controles que deberán evaluarse mediante la aplicación de técnicas de perfusión de órganos y específicas para la identificación de activación glial, desmielinización y daños neuronales.

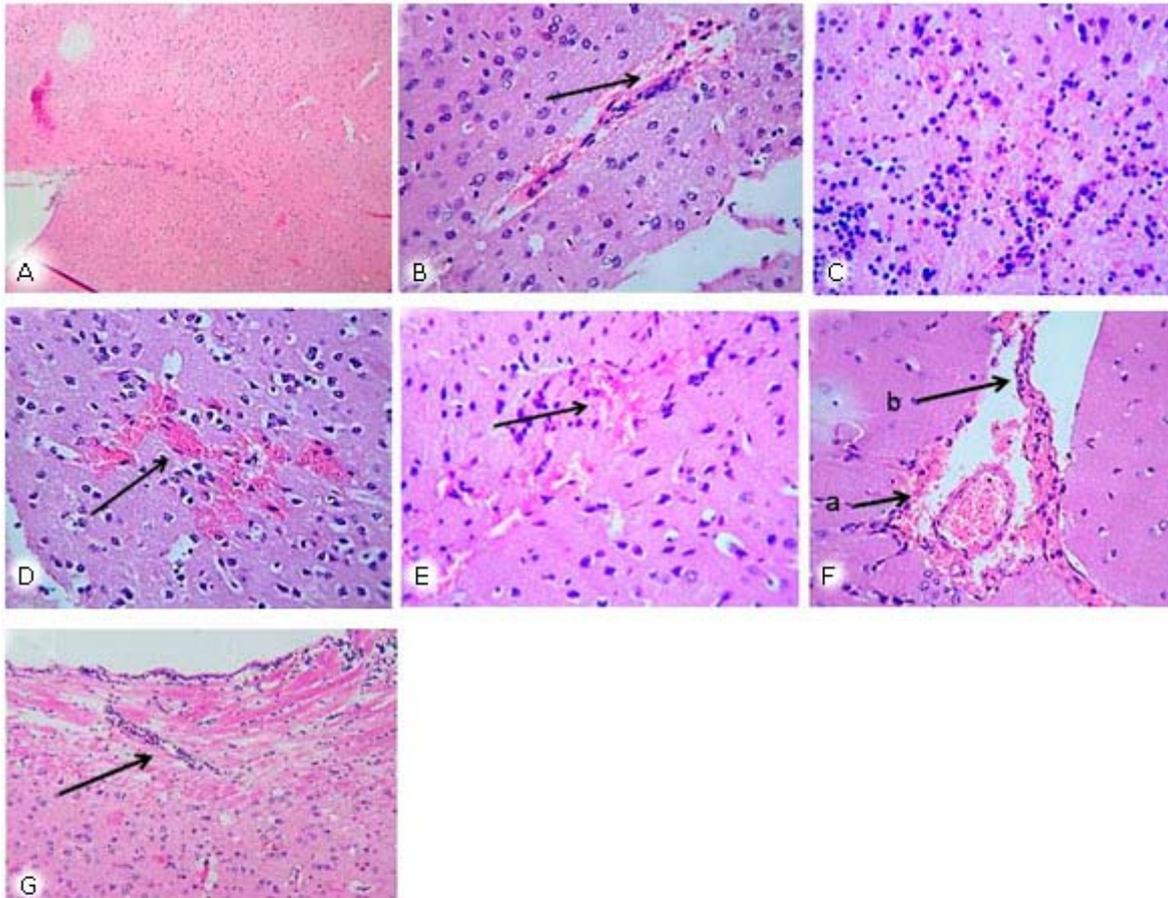


Fig. 2. A: Histomorfología normal de corte de encéfalo de animal no infectado en la región del cuerpo calloso (amplificado 100X). B: Observación de un área de microhemorragia (MH) pequeña en corteza cerebral de la muestra 2 de animales del grupo S (amplificado 400X). C: Observación de un foco hemorrágico difuso en sustancia blanca en el hipocampo cercano a los ventrículos de la muestra 3 de animales S (amplificado 400X). D: Observación de un área de MH extensa en cerebelo de la muestra 4 de animales S (amplificado 400X). E: Observación de un área de MH extensa en corteza cerebral de la muestra 5 de animales S (amplificado 400X). F: Observación de otra área vecina de MH extensa (a) y vaso sanguíneo taponado con eritrocitos y acumulación de leucocitos (b) en corteza cerebral de la muestra 5 (amplificado 400X). G: Observación de alteraciones tisulares y acumulación vascular de células inflamatorias en la región del cuerpo calloso de la muestra 2 de animales del grupo S (amplificado 100X).

DISCUSIÓN

La infección con estados eritrocíticos de parásitos del género *Plasmodium* causa una patología multiorgánica que varía de órgano a órgano en dependencia de la combinación hospedero-especie de *Plasmodium*. Esto es particularmente visible en modelos de malaria de roedores.¹² La observación diaria de los animales aportó datos que afirman la presencia de afectaciones neurológicas en los ratones de la sublínea C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka, que se presentaron en estado terminal entre los días 6 y 11 del estudio. Los signos neurológicos que se comprobaron fueron la ataxia, la parálisis parcial y las convulsiones, los cuales aparecen registrados frecuentemente en estudios previos.^{12,14,23} La manifestación de coma se describe también en múltiples investigaciones sobre MCE, aunque su

estimación en este modelo no está sujeta a un protocolo estandarizado¹⁶. Debido a su difícil diagnóstico, no se incluyó entre las observaciones realizadas.

La presencia de convulsiones y sus características son aspectos importantes a definir en la reproducibilidad del modelo, debido a que este signo neurológico es común a la malaria cerebral en niños (casi un 80 % ingresan por esta causa) y también se presenta como afectación neurológica en los adultos aunque es menos frecuente.²⁴ Las convulsiones tanto en pacientes pediátricos como adultos son usualmente tónico-clónicas generalizadas, mientras las convulsiones focales no son frecuentes y el estado epiléptico es muy raro.²⁴ Se considera que el daño causado a las neuronas por la presencia de áreas de perfusión reducida (hipoxia/isquemia) puede producir una alteración fisiológica que conduce a la actividad convulsiva; esta a su vez, puede empeorar este daño si se prolonga.²⁴ La dificultad en el aprendizaje es una de las secuelas de la infección severa por *P. falciparum* que se ha determinado que está asociada a factores de riesgo tales como la hipoglicemia, las convulsiones, la profundidad y duración del coma y la hiporrespuesta a los reflejos, principalmente en niños.²⁵ Aunque las investigaciones precedentes sobre el modelo de MCE tienen poca información sobre las características de estas afectaciones neurológicas, las observaciones de este estudio concuerdan con estudios recientes sobre MCE que informan del predominio de las convulsiones tónico-clónicas, en el contexto de evaluaciones realizadas con mayor precisión debido a la utilización de la video-electro-encefalografía.²⁶

En el grupo S, también se observó respiración anormal lo cual sugiere la afectación independiente de las funciones del encéfalo y de los pulmones, así como una posible relación patológica entre ambos órganos. Resultados recientes sugieren que en pacientes pediátricos la respiración falla centralmente, más que a consecuencia de una lesión anatómica del pulmón.²⁷ Sin embargo, como la taquipnea descrita en pacientes pediátricos puede tener causas diferentes como la fiebre, la acidosis metabólica y el daño pulmonar, se requiere continuar el estudio de la polipnea observada en este modelo murino.¹²

La característica histológica común en los tejidos encefálicos de los animales en el modelo de MCE que presentaron convulsiones, parálisis límbica y coma, ha sido la presencia de MH y hemorragias más extensas.^{11,18} Análogamente, en este trabajo se encontraron estas evidencias del daño vascular en la mayoría de las muestras estudiadas de los animales seleccionados con signos neurológicos.

La distribución y localización del daño vascular durante la MCE puede ser también importante ya que los resultados de investigaciones precedentes mostraron una correlación entre las áreas dañadas en la infección aguda (ej. en el tallo encefálico podrían estar relacionadas con dificultades en el centro respiratorio) y la mortalidad o la persistencia de las deficiencias motoras (ej. afectaciones en el cerebelo) y cognitivas (ej. las hemorragias en la corteza, hipocampo y fornix se vincularon significativamente a los defectos del aprendizaje).¹¹ La mayoría de las MH en esta evaluación de la infección de ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka se detectaron en gran parte de las localizaciones encefálicas destacadas en estudios anteriores como el bulbo olfatorio, corteza, ganglios basales, cerebelo y tallo encefálico, en los cuales se encontraron múltiples focos hemorrágicos en la materia gris y blanca.^{16,28} La información derivada de estudios paralelos *in vivo* muestra una migración de la ruptura de la BHE y el edema que sugiere que la reacción inflamatoria se extiende progresivamente desde el bulbo olfatorio hasta el tallo.²⁸

Estudios *posmortem* de pacientes pediátricos describieron la presencia de numerosas hemorragias petequiales ampliamente distribuidas en la materia blanca de los hemisferios cerebrales, en el tallo y en la materia blanca del cerebelo,

comprendida la folia, mientras en la materia gris aparecieron muy raramente.²⁷ Sin embargo, existen diferencias visibles entre los encéfalos de humanos y de ratones. Estas diferencias no impiden la relevancia de infecciones murinas para modelar enfermedades en humanos, debido a que se presentan regiones comparables y componentes básicos comunes, aunque en los ratones descansan sobre un patrón más lineal.²⁹

Los diversos hallazgos derivados de estudios en humanos y modelos experimentales enfocan la génesis de la MC como una interrelación entre mecanismos de secuestro, inflamación y hemostasia que producen la desestabilización de un componente común: la unidad neurovascular.³⁰ La ruptura de la BHE es fundamental en la fisiopatología de la MCE.^{12,30} En observaciones histológicas de encéfalos de animales afectados por la MCE, mediante microscopía óptica y electrónica, se ha descrito la presencia de ruptura de las paredes de los vasos acompañada de hemorragias, aunque en algunos casos los capilares están rodeados por eritrocitos y no se pudo detectar el daño a las paredes de estos conductos, lo cual apunta a un quebrantamiento parcial de la barrera endotelial.¹³ En los casos fatales de niños y adultos, existen evidencias similares de la ruptura de las paredes de los vasos incluso necrosis capilar, daños a los cuales se asocian la trombosis intraluminal y/o las hemorragias en anillo.²⁴ Este patrón establece dudas de si la formación de un pequeño trombo contribuye al daño inicial del vaso que da lugar a la MH o si el trombo se forma para cerrar el vaso afectado y detener el paso de eritrocitos hacia el parénquima.²⁷

Con la utilización reciente de métodos *in vivo* para estudiar la MCE, se mostró que la ruptura de la BHE facilita la retención de numerosas células T CD8⁺, macrófagos ICAM-1⁺ y neutrófilos en las paredes de las vénulas. Al demostrar que se producen alteraciones que disminuyen el eflujo venoso en las vénulas poscapilares, se adiciona la hipótesis de que el flujo venoso reducido exacerba el escape vascular, el edema encefálico y las hemorragias³⁰. Esto conduce al aumento de la presión intracraneal y la compresión del centro respiratorio como posibles causas de muerte en la MCE, comparables a la MC en adultos y niños.^{24,27}

En resumen, la presencia de MH encefálicas en ratones C57BL/6/Cenp infectados con *P. berghei* Anka constituyó un indicador de MCE, al igual que la detección de signos neurológicos como la ataxia, la parálisis parcial y las convulsiones. Otras características patológicas asociadas con la MCE deberán estudiarse posteriormente, tales como el edema, la afectación respiratoria, la activación glial y los daños neuronales.

Agradecimientos

A los especialistas José Suárez Alba del departamento de Anatomía Patológica del bioterio del CIGB y Jorge Cantillo Padrón del bioterio del IPK, por compartir sus valiosos conocimientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Severe falciparum malaria. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 2000;94:S1-S90.

2. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria- inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;49:100.
3. Shikani HJ, Freeman BD, Lisanti MP, Weiss LM, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Cerebral malaria. We have come a long way. *Am J Pathol.* 2012;181:1484-92.
4. Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002401.
5. Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BPT, Andrade BG, Souza TM, et al. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malar J.* 2010;9:85.
6. Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, et al. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet.* 2008;22:315-31.
7. Geurts N, Martens E, Verhenne S, Lays N, Thijs G, Magez S, et al. Insufficiently defined genetic background confounds phenotypes in transgenic studies as exemplified by malaria infection in TLR9 knockout mice. *PLoS ONE.* 2011;6:e27131.
8. National-Academies.org [Internet]. Washington: Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) International Laboratory Code Registry. [cited 2014 Nov 6]. Available from: <http://www.dels.nas.edu/global/ilar/Lab-Codes>
9. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M, Alonso R, González-Neira A, López-Jiménez A, et al. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res.* 2011;20:481-9.
10. Waknine-Grinberg J, Hunt N, Bentura-Marciano A, McQuillan J, Chan H, Chan W, et al. Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J.* 2010;9:227.
11. Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, et al. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microb Infection.* 2010;12:1198-207.
12. Epiphany S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataíde R, et al. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000916.
13. Lackner P, Beer R, Helbok R, Broessner G, Engelhardt K, Brenneis C, et al. Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malar J.* 2006;5:116.
14. Clemmer L, Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJM. Artemether and artesunate show the highest efficacy to rescue mice with late-cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1383-90.
15. Combes V, Guillemin GJ, Chan-Ling T, Hunt NH, Grau GER. The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends Parasitol.* 2012;28:311-9.

16. Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32:177-88.
17. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Frevert U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002982.
18. Carroll RW, Wainwright MS, Kim KY, Kidambi T, Gomez ND, Taylor T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE.* 2010;5:e13124.
19. Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Regulación 64-2012: Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los Comités Institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL). Resolución 11-2013. La Habana: CECMED; 2013.
20. Lopes de Souza N, Bernardino Merusse JL. Capítulo 9. Identificacao e registros. En: Comissao de Ensino COBEA, editor. Manual para técnicos em bioterismo. 2da ed. Sao Paulo: Winner Graph; 1996.
21. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St. Jean P, Schork NJ, Mulholland N, et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci.* 1999;19:6733-9.
22. Asociación Holandesa para la Ciencia de Animales de Laboratorio (NVP). Humane endpoints in Laboratory Animal Experimentation [CD-ROM]. Netherlands: NVP; 2006.
23. Solomon W, Wilson NO, Anderson L, Pitts S, Patrickson J, Liu M, et al. Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria. *J Neuroinflammation.* 2014;11:9-22.
24. Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria. The role of the endothelial barrier. *Virulence.* 2013;4:543-55.
25. Kihara M, Carter JA, Holding P, Vargha-Khadem F, Scott RC, Idro R, et al. Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage. *Malar J.* 2009;8:273.
26. Buckingham SC, Ramos TN, Barnum SR. Complement C5-deficient mice are protected from seizures in experimental cerebral malaria. *Epilepsia.* 2014;55:e139-42.
27. Milner DA, Whitten RO, Kamiza S, Carr R, Liomba G, Dzamalala C, et al. The systemic pathology of cerebral malaria in African children. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:104.
28. Hoffmann A, Pfeil J, Alfonso J, Kurz FT, Sahm F, Heiland S, et al. Experimental Cerebral Malaria Spreads along the Rostral Migratory Stream. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005470.
29. Treuting PM, Dintzis SM, Frevert CW, Montine KS. Comparative Anatomy and Histology: A mouse and human atlas. San Diego: Academic Press; 2012.

30. Nacer A, Movila A, Sohet F, Girgis NM, Gundra UM, Loke P, et al. Experimental cerebral malaria pathogenesis-hemodynamics at the blood brain barrier. PLoS Pathog. 2014;10:e1004528.

Recibido: 8 de junio de 2015.

Aceptado: 30 de marzo de 2017.

Judith Mendiola Martínez. Departamento de Parasitología. Centro de Investigaciones, Diagnóstico y Referencia (CIDR). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6½, Lisa. La Habana, Cuba.
Correo electrónico: mendiola@ipk.sld.cu