



# Modelos animales para la malaria cerebral y su aplicabilidad para la investigación de nuevos fármacos

Bárbara Judith Mendiola<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Habana, Cuba.

## RESUMEN

**La malaria cerebral es una de las complicaciones más importantes de la infección con *Plasmodium falciparum*. El 40% de la población mundial vive en áreas afectadas por la malaria, lo que ha resultado en aproximadamente 243 millones de casos clínicos y 863000 muertes en el 2008, la mayoría en niños menores de 5 años del África subsahariana. La malaria cerebral presenta un gran desafío en el esclarecimiento de su fisiopatología. Aunque no existe un modelo experimental que reproduzca todos los aspectos de la enfermedad en humanos, los modelos murinos han sido el instrumento más provechoso, entre ellos la infección de hospederos susceptibles con la cepa ANKA de *Plasmodium berghei* es el más generalizado. Los estudios de patogenia de la malaria cerebral experimental están fundamentados por más de 20 años de investigación. Este trabajo revisa los hallazgos recientes y selecciona los elementos cardinales que sustentan la relevancia y operatividad de estos modelos. Concluye que la caracterización conductual precisa y la descripción de los cambios histológicos, metabólicos e inmunológicos concomitantes en los modelos actuales pueden ser herramientas útiles para investigar las dianas y la efectividad de futuras intervenciones terapéuticas. Palabras-claves: Malaria cerebral. *Plasmodium berghei*. Modelos experimentales. Fisiopatología. Antimaláricos. Farmacoterapéutica.**

## INTRODUCCIÓN

La malaria cerebral es una de las complicaciones más importantes de la infección con *Plasmodium falciparum*. Además de producir una alta tasa de mortalidad en la población infantil afectada, los casos que sobreviven pueden presentar problemas motores o cognitivos.

La malaria cerebral es una enfermedad que presenta un gran desafío en la elucidación de su fisiopatología. Está además influenciada por variados factores del huésped, del parásito y epidemiológicos. Aunque no existe un modelo experimental que reproduzca todos los aspectos de la enfermedad en humanos, los modelos murinos han sido el

instrumento más provechoso, y entre ellos la infección de hospederos susceptibles con la cepa ANKA de *Plasmodium berghei* es el más generalizado.

Este modelo ha permitido realizar numerosos estudios de intervención, en los cuales se ha determinado el efecto del bloqueo o adición de un mediador específico, así como de numerosas alternativas terapéuticas. La mayoría de las aproximaciones estudiadas han hecho posible demostrar si un factor es necesario o no para el proceso patogénico, aunque el rol preciso y la secuencia de eventos durante el curso de la enfermedad aún no están esclarecidos. Sin embargo, los modelos animales han sido extremadamente valiosos en el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos de alta eficacia como los derivados de artemisinina.

Los estudios de patogenia de la malaria cerebral experimental están fundamentados por más de 20 años de investigación. Actualmente estos estudios enfrentan el reto de evaluar las potencialidades de moléculas con actividad farmacológica conocida con el objetivo de rescatar los animales en estados de pleno desarrollo de la malaria cerebral y de demostrar su aplicabilidad como modelo de la enfermedad en humanos. El presente trabajo tiene como objetivo identificar las evidencias en este campo investigativo que contribuyen a que se fundamenten la relevancia y operatividad de los modelos experimentales de la malaria cerebral.

## Malaria, aspectos generales y manifestaciones clínicas

La Organización Mundial de la Salud estima que el 40% de la población mundial vive en áreas afectadas por la malaria, lo cual ha resultado en aproximadamente 243 millones de casos clínicos y 863000 muertes en el 2008, la mayoría en niños menores de 5 años del África subsahariana (OMS, 2009). En América Latina y el Caribe, la transmisión de la malaria continúa en 21 países, donde el 31% de la población vive en zonas donde persiste algún riesgo de transmisión aunque la contribución a la morbilidad global es significativamente menor, así como a la mortalidad. Se ha observado que la ocurrencia de casos severos está fuertemente influenciada por la resistencia a múltiples fármacos, por la presencia de infecciones mixtas y por limitaciones en el diagnóstico. Sin embargo, la publicación de reportes sobre manifestaciones clínicas en esta región es muy poco frecuente (Arévalo-Herrera et al., 2012). En áreas libres de esta enfermedad, el número de casos importados a través de viajeros e inmigrantes se incrementa en la actualidad (Calleri et al., 2011).

*Autor correspondiente:* Bárbara Judith Mendiola - Departamento de Parasitología - Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí - Autopista Novia del Mediodía km 6 ½ - PO Box 601 - Marianao 13 - Habana - Cuba  
e-mail: mendiola@ipk.sld.cu - teléfono: 5372553641

Cinco especies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* y más recientemente *P. knowlesi*, parásito de simios (Cox-Singh et al., 2008), pueden causar enfermedad en humanos. La gran mayoría de los casos de malaria severa se producen por la infección con la especie *P. falciparum* (Rojas, 2001).

Las formas clínicas de la malaria varían desde las asintomáticas hasta el progreso a complicaciones tales como el fallo renal, sangramiento, hemoglobinuria, vómitos, fiebre alta, colapso circulatorio, edema pulmonar, anomalías placentarias, anemia severa (hemoglobina por debajo de 5g/dl), acidosis, hipoglicemia, ictericia, malaria cerebral (alteración del estado de conciencia y otras manifestaciones neurológicas) que pueden llevar a un cuadro clínico denominado malaria severa, causante de un elevado número de muertes (Martins et al., 2009a). Este cuadro generalmente se presenta acompañado de hiperparasitemia.

En áreas de alta transmisión, la susceptibilidad a la malaria severa varía con la edad y la exposición al parásito; los adultos son, en general, resistentes a la malaria severa mientras que los infantes y los niños muy pequeños presentan un mayor riesgo. Se ha demostrado que la edad media de ingreso a hospitales con anemia severa es menor que la de los ingresos con malaria cerebral, independientemente de la intensidad de transmisión (Roca-Feltrer et al., 2010). En escenarios de África subsahariana, que transitan hacia un declive de la transmisión, es importante estar alertas de un posible cambio hacia la relativa mayor importancia de la malaria cerebral en comparación con la anemia severa para edades mayores que las actuales, aunque el 75% de todos los ingresos pediátricos con malaria severa deberán continuar en niños menores de 5 años (Roca-Feltrer et al., 2010).

También las embarazadas y los adultos no inmunes presentan un mayor riesgo de desarrollar malaria severa. La epidemiología de la malaria severa es altamente sugestiva de la participación del sistema inmune tanto en la iniciación (en niños) como en la protección (en adultos) de la malaria cerebral, ya sea indirectamente (mediante la selección para la infección con parásitos de virulencia diferente) o directamente (contribuyendo a la patogenia del síndrome) (De Souza et al., 2010).

## Malaria cerebral

La malaria cerebral (MC) es la complicación de mayor peligro para la vida. Varios autores plantean que su incidencia es difícil de calcular, pero los estudios publicados sobre admisión a los hospitales de África subsahariana indican que 1,77 por 1000 ingresos pediátricos en un año corresponden a malaria cerebral y 3,6 por 1000 ingresos corresponden a episodios de anemia severa que pueden estar acompañados de otros síndromes como la malaria cerebral, los cuales representan alrededor de 545000 casos severos hospitalizados (Roca-Feltrer et al., 2008). Estudios recientes indican que en algunos países donde se han aplicado adecuadas estrategias de manejo de los pacientes han reducido el índice anual de muertes por malaria severa hasta un 3.2% del total de casos diagnosticados con esta condición, lo cual aporta evidencias sobre la

malaria cerebral que constituyó el 47,3% de los casos (Msangeni et al., 2011). En un estudio reciente en Senegal, se obtuvo una mayor letalidad, 11.1% del total de casos hospitalizados diagnosticados con malaria severa, en los que los principales factores de riesgo fueron la edad, el coma, la dificultad respiratoria o la hipoglicemia (Camara et al., 2011). Además, al menos el 10-20% de los casos que sobreviven y se recuperan de la malaria cerebral, muestran problemas motores o cognitivos (De Souza et al., 2010).

Aunque en el pasado el término de MC se aplicó a un amplio rango de manifestaciones neurológicas (en la malaria severa se puede afectar el sistema nervioso central produciendo postración, irritabilidad y alteraciones del estado consciente), actualmente la OMS ha definido esta enfermedad como un síndrome clínico caracterizado por coma que persiste durante al menos 1 hora después del término de una convulsión o la corrección de hipoglicemia que ocurre durante una infección con *P. falciparum* y sin la presencia de otras causas de encefalopatía (WHO, 2000). Sin embargo, en la práctica el diagnóstico clínico en áreas endémicas de MC, malaria severa e incluso la infección palúdica es difícil. Los síntomas clínicos asociados con los estados tempranos de MC no son patognomónicos de esta enfermedad y son difíciles de diferenciar de la encefalitis, meningitis y convulsiones febriles. Esto trae implicaciones para el diagnóstico rápido y temprano de la condición, la cual con frecuencia demora significativamente el inicio del tratamiento. Es frecuente la presencia de diagnósticos errados o sobrediagnóstico (Perisse & Strickland, 2008).

El cuadro clínico se instala gradual pero rápidamente. Se puede presentar cefalea intensa, cambios en la conducta y más tarde manifestaciones neurológicas diversas, como obnubilación mental, delirio, espasticidad, hiperreflexia, Babinsky positivo, disartria, ataxia, clonus, alteraciones de la sensibilidad superficial, incontinencia, convulsiones tónico clónicas, parálisis facial y trismo (Rojas, 2001). En los niños, la MC comienza con una historia de 1 a 4 días de fiebre, toma del estado general, anorexia, irritabilidad, vómitos, tos y una o más convulsiones antes de la llegada del coma. Durante el coma ocurren otras manifestaciones neurológicas y otros cambios clínicos que han sido descritos con detalle (Martins et al., 2009a). La diversidad de complicaciones neurológicas asociadas a la MC indica que se afectan varias áreas del encéfalo (De Souza et al., 2010).

## Anatomía patológica de la malaria cerebral y su relación con las condiciones clínicas

Desde el descubrimiento por Marchiafava y Bignami en 1894 de que los parásitos maláricos se hallan dentro del cerebro de los humanos durante la infección, se ha centrado la atención en comprender los procesos fisiopatológicos que predisponen a la MC, con el propósito de desarrollar medidas preventivas o terapias dirigidas a evitarla. En un inicio, se plantearon teorías contrastantes sobre la participación del secuestro de parásitos en el encéfalo y de la respuesta inmune del hospedero; actualmente, se sugiere que la neuropatología es el resultado de una combinación de ambos procesos (Van der Heyde et al., 2006).

El examen post-mortem de cerebros de individuos que murieron de MC ha ayudado a descubrir el tipo y la

distribución de la patología cerebral que ocurre durante esta enfermedad. Algunos de los hallazgos incluyen el edema y las hemorragias en la sustancia blanca de la región subcortical y el cuerpo calloso, así como las hemorragias encefálicas en las cortezas cerebral y cerebelar (Haldar et al., 2007).

En la mayoría de los casos, el examen histopatológico revela capilares cerebrales taponados con eritrocitos parasitados. El secuestro ocurre como consecuencia de la expresión de proteínas de adhesión de *P. falciparum* sobre la membrana de eritrocitos infectados, los cuales se unen a ligandos expresados en las células endoteliales durante la infección (Togbe et al., 2007). También son características la marginación de monocitos y macrófagos dentro de los vasos cerebrales y la presencia de macrófagos pigmentados, con eritrocitos parasitados (Haldar et al., 2007). Debido a la ausencia de estudios histopatológicos comparados en casos pediátricos y de adultos con MC, es difícil concluir si la patología de MC varía entre éstos (Hunt et al., 2006), pero dado que sí existen diferencias en los síntomas, es posible que existan diferencias en la patología cerebral relacionadas con la edad.

El secuestro de parásitos, las hemorragias y la inflamación se encuentran en la mayoría de los cerebros enfermos, pero MC no es un síndrome homogéneo. Algunos autores consideran que más de una vía patogénica puede llevar a la MC humana y que ésta puede ocurrir a pesar de que se observe un secuestro mínimo de parásitos en el cerebro (Rénia et al., 2010). Por ejemplo, 3 diferentes patrones de cambios histopatológicos se han descrito en niños africanos: 1) patrón clásico de secuestro de parásitos con las hemorragias perivasculares y la infiltración de células inmunes dentro de los pequeños vasos cerebrales, 2) secuestro de parásitos sin otras anomalías y 3) no se encuentran evidencias de secuestro del parásito dentro del encéfalo. Las razones de estas variaciones en la patología de MC no están claras, pero se estima que se deben a variaciones genéticas en los hospederos o en los parásitos, factores ambientales o la respuesta inmune frente al parásito (De Souza et al., 2010).

La MC es considerada una enfermedad multifactorial. Aunque la adhesión de eritrocitos infectados es el principal hallazgo en la patología, varios factores inmunológicos (leucocitos, citoquinas y quimoquinas), plaquetas, óxido nítrico y sus neutralizadores, así como la hemozoína, entre otros, están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Estos factores integran una respuesta inflamatoria sistémica que se considera es responsable de los síntomas y signos neurológicos presentados por los pacientes (Martins et al., 2009a).

### **Participación de la respuesta inmune en la patogenia de la malaria cerebral**

El perfil de citoquinas característico y asociado con la MC provee evidencias que relacionan la respuesta inmune con la etiología de esta enfermedad. En los enfermos con MC, se observan altas concentraciones plasmáticas de TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1, IL-6; lo que resulta en un balance desfavorable de la relación citoquinas pro-/anti-inflamatorias en comparación con pacientes con malaria

no complicada. Sin embargo, la dificultad de llevar a cabo estudios de mecanismos en humanos no permite esclarecer la relación causal de esas respuestas inflamatorias con la aparición de la MC (De Souza et al., 2010).

Los estudios de modelos experimentales, en especial con *Plasmodium berghei* ANKA indican que la malaria cerebral experimental es una enfermedad mediada por células T. Se considera que la mayor parte del escenario fisiopatogénico de la MC ha sido descrito basándose en los modelos murinos. En particular, se involucran células T citotóxicas CD8+ en la destrucción de la barrera hematoencefálica mediante perforinas. Se considera que la muerte en la MCE es un resultado de la inflamación estimulada por el parásito. La respuesta inmune descontrolada y perjudicial es principalmente del tipo Th1, con superproducción de algunas citoquinas, tales como IFN $\gamma$ , combinada con la subproducción de otras como la IL-10 (Waknine-Grinberg et al., 2010). Sin embargo, no existe una definición clara de la secuencia de eventos durante el curso de la enfermedad.

### **Tratamientos actuales y necesidad de nuevas alternativas terapéuticas**

El manejo de la malaria severa comprende cuatro áreas fundamentales: el examen clínico del paciente, el tratamiento antimalárico específico, la terapia adyuvante y los cuidados de soporte (OMS, 2006).

Los tratamientos de primera línea para pacientes con MC son las terapias basadas en fármacos antimaláricos; sin embargo, la incidencia de deficiencias neurológicas y la mortalidad se mantienen inaceptablemente altas, con porcentajes fatales de aproximadamente 15% cuando se administra artemisinina (artesunato, artemeter y artemotil) y de 20% para los tratamientos tradicionales con quinina (Dondorp et al., 2010). No se recomiendan los antimaláricos que a nivel global se considera que hay resistencia (cloroquina o sulfadoxina-pirimetamina) (OMS, 2006). La alta mortalidad no es inesperada si consideramos que la terapia se implementa cuando la MC se sospecha o se diagnostica en un centro de salud, circunstancias en que la MC ha avanzado en la mayoría de los casos afectados y el tratamiento esquizotónico por sí solo es insuficiente para revertir o aliviar los síntomas de MC (De Souza et al., 2010).

En un intento por reducir la mortalidad inaceptablemente alta de la MC, varios tratamientos dirigidos a las complicaciones han sido evaluados en pruebas clínicas, en conjunto con los fármacos antimaláricos. Las complicaciones más frecuentes son el coma, la hiperpirexia, las convulsiones, la hipoglicemia, la anemia severa, el edema pulmonar agudo, el fallo renal, los sangramientos espontáneos y las coagulopatías, la acidosis metabólica, el shock y la hiperparasitemia. Ante éstas, de acuerdo a su naturaleza, se aplican como soluciones las medidas de soporte, las transfusiones para intercambio de glóbulos rojos, la diuresis osmótica, la corrección de la hipoglicemia, acidosis e hipovolemia, la administración de anticonvulsivos, el tratamiento con antimicrobianos, entre otras (OMS, 2006).

Existen además varias estrategias de soporte e intervenciones que han sido propuestas en la MC,

pero que han reflejado poco beneficio o mostrado desventajas. Estas incluyen a la heparina, prostaciclina, pentoxifilina, dextranos de bajo peso molecular, urea, ácido acetilsalicílico, anticuerpos anti TNF-alfa, ciclosporina, dicloroacetato, adrenalina y sueros hiperinmunes. Además, de acuerdo a las evidencias acumuladas hasta el presente, no se recomienda el uso de altas dosis de corticosteroides o quelantes de hierro (OMS, 2006).

En el tratamiento de la MC, la prevención del déficit neurológico es también un importante objetivo. Debido a esto, se ha planteado una necesidad urgente de desarrollar terapias complementarias, tales como inmunomoduladores o agentes neuroprotectores que podrían ser administradas junto con los antimaláricos. Estas alternativas persiguen contrarrestar los efectos de factores del huésped asociados y se fundamentan en la hipótesis inflamatoria o inmunológica de base para la patogenia de MC. Actualmente, la carencia de conocimientos sobre la patogénesis de la MC, provoca que las dianas más eficaces para intervenciones terapéuticas aún no se hayan identificado (De Souza et al., 2010).

En la búsqueda de nuevas dianas, un gran número de intervenciones han sido experimentadas en modelos animales. White et al. (2009) han resumido el uso de diferentes intervenciones entre las cuales menciona el uso de anticuerpos contra TNF ó CD41 ó CD61 ó CD25, la administración de dexametasona, pentoxifilina, aspirina, albúmina, antioxidantes, IL1, IL-10rec, eritropoyetina, simvastatin, oxígeno hiperbárico, glatiramer y rosiglitazone; la depleción de células CD4 ó CD8 y el empleo de estrategias anti-apoptosis, entre otras. La mayoría de estos estudios fueron diseñados para investigar la fisiopatología de la MC murina y para definir el rol de una célula, molécula o vía metabólica en particular durante el desarrollo de la enfermedad. Esta aproximación es apropiada, necesaria y válida para la identificación de mecanismos patogénicos y la búsqueda de dianas para intervenir en éstos (Carvalho et al., 2010).

En casos humanos de MC, se han probado 11 alternativas terapéuticas en 17 pruebas clínicas (White et al., 2009), resultando en las recomendaciones de la OMS anteriormente descritas. Esto ha dado lugar a un desacuerdo entre los resultados dramáticamente beneficiosos de las intervenciones en modelos murinos y los resultados posteriores en pruebas clínicas. Actualmente los investigadores coinciden en que para evaluar la eficacia en la reducción de la parasitemia de los fármacos o productos naturales en estudio, es recomendable aplicar la prueba de supresión de Peters et al. (1975) que después de 4 administraciones consecutivas al inicio la infección permite seleccionar además la dosis relativamente menos tóxica (Mendiola et al., 2006; Rodríguez-Pérez et al., 2006; Fernández Calienes-Valdés et al., 2011). Sin embargo, las evaluaciones de las nuevas alternativas terapéuticas en modelos de MCE deberán implementarse a través de esquemas en los que éstas se administren de conjunto con las drogas antimaláricas de referencia y una vez que los síntomas neurológicos ya se han desarrollado, ya que éste es el contexto real de su uso en el tratamiento de pacientes con MC (Carvalho et al., 2010, Riley et al., 2010, Dai et al., 2010; Clemmer et al., 2011).

## **El impacto esperado de las vacunas sobre la severidad de la infección palúdica**

RTS,S es el candidato vacunal más avanzado en las pruebas clínicas. Está compuesto por una porción de la proteína CSP del esporozoito que contiene epitopos para células B fusionados a epitopos para células T CD4+ y CD8+ de proteínas de superficie del virus de la hepatitis B. Esta vacuna puede inducir protección a corto plazo en adultos no inmunes y una protección parcial, de mayor duración, contra la malaria severa en niños africanos, su población diana. Desafortunadamente, la eficacia general en las pruebas clínicas avanzadas debe aumentar significativamente. Se ha considerado que las vacunas de estados eritrocitarios podrían actuar solamente como vacunas que controlen la enfermedad, pero esto no ha sido posible demostrarlo a partir de pruebas en humanos. Los candidatos líderes MSP1<sub>19</sub>, MSP1<sub>42</sub>, y AMA1 han mostrado efecto antiparasitario muy modesto o nulo. Se ha sugerido que los resultados podrían mejorar a partir de la adición de otras proteínas para componer una vacuna de subunidad. También ha sido una preocupación el polimorfismo antigénico observado. En ambos casos, es un reto vital mejorar las tecnologías de evaluación ya que no será posible evaluar todos los antígenos y adyuvantes novedosos en la clínica, sino lograr una mayor robustez en los criterios de selección que permitan una mayor agilidad en la ruta de desarrollo de los candidatos vacunales (Plebanski et al., 2008; Langhorne et al., 2011).

## **Limitaciones de los estudios de la patogenia de la MC en humanos**

La importancia relativa de los eventos sistémicos y locales, su secuencia y aparición en la patogenia de MC, se desconoce. Por razones obvias, el examen histopatológico de encéfalos dañados está limitado a los casos fatales y de este modo no es posible describir la secuencia de eventos que llevan al inicio de los síntomas de MC ni comparar los casos fatales con aquellos que se resuelven en respuesta al tratamiento. Estas investigaciones y comparaciones son esenciales para delinear los procesos sistémicos y cerebrales verdaderamente patogénicos, a partir de respuestas protectoras y/o neutras.

La gran utilidad de los métodos imagenológicos, no invasivos, tales como la resonancia magnética, la espectroscopia y la topografía computacional, ofrecen una esperanza de resolver estos aspectos, pero esos estudios son limitados debido a que presentan restricciones éticas y requieren el uso de equipamiento especializado muy costoso para las áreas endémicas de malaria. Es por ello que resulta extremadamente difícil avanzar más allá de los estudios puramente descriptivos y de correlación en humanos, hacia los que definen las vías inmunológicas y los procesos estimulados por el parásito que representan la base de la patogenia y que demuestran causalidad, ya que se hace necesario realizar estudios de intervención. Además, el examen de la sangre periférica (lo cual es posible en los casos fatales y no fatales) puede proveer información limitada sobre el ambiente parasitológico e inmunológico

en el encéfalo y los pacientes arriban al hospital una vez que el síndrome está bien establecido (De Souza et al., 2010). Estas evidencias revelan que otros acercamientos son necesarios, en combinación con los estudios en humanos, para entender completamente la patogénesis de MC.

### Modelos experimentales de malaria cerebral

Gran parte del conocimiento actual sobre la fisiología de los mamíferos ha provenido de estudios con animales. El grado de conservación de procesos básicos, tales como los inmunológicos y los neuropatológicos, pone en evidencia su aparente similitud. Los modelos experimentales han demostrado ser una valiosa herramienta para investigar la patogenia de numerosas enfermedades infecciosas y autoinmunes que padecen los seres humanos, así como varias vacunas y terapias inmunes que están en uso en la actualidad, fueron previamente desarrolladas y probadas en modelos experimentales. El uso de modelos experimentales puede ayudar significativamente en el estudio de la malaria cerebral. Entre los modelos de primates para MC tenemos las infecciones con *P. knowlesi* y *P. coatneyi* en monos Rhesus y con *P. falciparum* en monos ardilla, sin embargo estos modelos resultan excesivamente costosos y presentan restricciones a trabajar solamente con un pequeño número debido a consideraciones éticas. Por ello se han desarrollado otros modelos. Se ha observado que ciertas cepas de ratones consanguíneos infectados con varias cepas de *P. berghei* o la cepa letal (XL) de *P. yoelii* desarrollan síndromes neurológicos (Lou et al., 2001; Martins et al., 2009b), sin embargo han existido diferencias de criterios dentro de la comunidad científica en relación a los modelos murinos y el nivel de similitud con la malaria cerebral humana para catalogarlos como relevantes y útiles.

### Malaria cerebral experimental (MCE) producida por *Plasmodium berghei* ANKA

El modelo de *P. berghei* ANKA (PbA) replica muchos eventos que se observan durante la malaria cerebral humana y se acepta que es el mejor entre los disponibles. La infección de cepas susceptibles de ratones, tales como C57BL6 y CBA, lleva al desarrollo de una patología cerebral fatal, con signos clínicos tales como ataxia, dificultad respiratoria y coma. El momento de comienzo de los signos clínicos varía en dependencia de la dosis de infección, el background genético del hospedero y el clon específico de los parásitos infectantes, pero es típicamente entre 5 y 10 días posteriores a la infección. Como en los humanos, existe un rápido deterioro en la condición de los animales infectados una vez que los síntomas clínicos aparecen, y la muerte sobreviene en las posteriores 4 ó 5 horas. Múltiples áreas de ruptura de la barrera hematoencefálica con escape vascular en la corteza, el cerebelo y el bulbo olfatorio, la pérdida de poblaciones neuronales específicas dentro de la corteza y el cuerpo estriado, la acumulación de eritrocitos parasitados dentro de los vasos sanguíneos y la inflamación perivascular focal, se observan en los cerebros de ratones infectados con PbA y que muestran signos de MCE. La MCE se asocia además con la acumulación significativa de plaquetas dentro de los vasos cerebrales:

se ha observado que estas plaquetas promueven el daño a las células endoteliales durante la infección. Problemas de disminución de la memoria visual durante la infección con PbA se correlacionan directamente con la hemorragia, la inflamación y con la activación microglial. La acumulación de monocitos y macrófagos y la activación de células mononucleares residentes como los astrocitos y las células microgliales se consideran elementos claves de la MCE (Lou et al., 2001; Lackner et al., 2006a; Bucher et al., 2011; McQuillan et al., 2011).

El secuestro de eritrocitos infectados con PbA en el cerebro de ratones susceptibles es un asunto de debate, ya que algunos estudios demuestran que el secuestro se correlaciona con el desarrollo de MCE (Rest, 1982; Jennings et al., 1998, Hearn et al., 2000, Beghdadi et al., 2008, Amante et al., 2007, Randall et al., 2008, Nie et al., 2009) mientras otros no han podido demostrar o evidenciar el secuestro de eritrocitos en este órgano (Franke-Fayard et al., 2005). Los eritrocitos infectados con PbA se han observado atrapados por leucocitos adherentes y eventualmente contribuyeron a la obstrucción vascular (Jennings *et al* 1998; Hearn et al., 2000). Carvalho (2010) considera que la interacción directa de eritrocitos parasitados con el endotelio no se evidenció porque es de muy corta duración.

Justifica el modelo, que las causas y consecuencias del secuestro parecen ser muy similares en ambos síndromes, aunque el tipo de célula que es secuestrada en la MC humana o murina sea diferente. Por ejemplo, se observó activación endotelial y disfunción, aumento de la expresión de moléculas de adhesión (eCAMs) en el encéfalo y otros lechos vasculares que los hacen receptivos a la adhesión de leucocitos, las plaquetas o los eritrocitos infectados. Si la obstrucción mecánica del flujo sanguíneo es la causa de MC en humanos, la patología es por ello aún similar a la MCE en roedores, incluso si los leucocitos reemplazan a los eritrocitos infectados como los principales y no los únicos agentes obstructivos. Otras consecuencias que se pueden mencionar como similares son: las microhemorragias, el edema y otros indicadores de vasculopatía severa (Carvalho, 2010).

Podría esperarse del predominio de leucocitos, diferentes efectos sobre el microambiente proximal; sin embargo se ha visto que en ambos casos las células endoteliales asumen un fenotipo pro-inflamatorio y pro-coagulante y sufren apoptosis. Estas similitudes indican que el modelo puede ser útil para probar intervenciones terapéuticas, en particular aquellas dirigidas a mejorar la perfusión o reducir el daño isquémico (Carvalho, 2010).

### Aplicación de los protocolos SHIRPA para identificar MCE en los animales infectados

Los estudios en el tema de la malaria experimental con PbA han determinado el daño cerebral a través de la aplicación de unas pocas características clínicas simples y en cierto grado inespecíficas, tales como la presencia de coma y convulsiones, las cuales están basadas en estimaciones individuales y no están sujetas a un protocolo estándar. Además, es necesario un acercamiento a determinar la severidad del proceso de enfermedad en una manera reproducible. El protocolo SHIRPA (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell MRC Mouse Genome

Centre and Mammalian Genetics Unit, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, Royal Hospital London, St. Bartholomew's and Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment) es un protocolo sistemático, aceptado para cuantificar el perfil de cambios funcionales y conductuales en un modelo bien establecido de enfermedad neurológica infecciosa (Lackner *et al* 2006b, Martins *et al.*, 2010).

Los datos obtenidos a través de la aplicación de la batería de ensayos del protocolo SHIRPA confirmaron que los animales que sufrieron MCE desarrollaron un amplio rango de deterioros funcionales y conductuales en el curso progresivo de la enfermedad, si los comparamos con animales controles sanos y animales infectados con PbA sin daño neurológico. Adicionalmente, para algunas mediciones, se observaron diferencias en la conducta y en la función entre animales sanos y aquellos infectados pero sin MCE, dando la información de que hay algunos parámetros conductuales que se afectan sin relación con el daño neurológico. Se aclara que estas afectaciones fueron más marcadas en los animales con daño cerebral. (Lackner *et al* 2006b, Martins *et al.*, 2010).

El grupo de animales que post-mortem se demuestra la enfermedad cerebral, se diferencia de los infectados que no la presentaron en cuanto a: la temperatura es extremadamente baja (<30 °C) 36 h antes de la muerte, la irritabilidad disminuye; la función sensorial medida a través de la respuesta de susto y la colocación visual se daña; las funciones motoras y la coordinación observadas a través de la posición del cuerpo y el tono, la elevación pélvica, el tono límbico y agarre de las patas, la maniobra en alambre, geotaxis negativa y reflejo postural muestran una afectación significativa. La frecuencia respiratoria se altera solamente en los animales con enfermedad cerebral (Lackner *et al.*, 2006b).

La hipotermia es una característica común de las enfermedades infecciosas murinas y se considera que predice estado terminal en este modelo (Clemmer *et al.*, 2011; Bucher *et al.*, 2011). La irritabilidad es un indicador del estado de conciencia que se altera significativamente y antes que otros parámetros funcionales (Lackner *et al.*, 2006b). El daño en la agudeza visual pudiera ser explicado por cambios en la retina que fueron descritos anteriormente (Birbeck *et al.*, 2010). La menor respuesta de susto podría reflejar déficit en las vías auditivas y somatosensoriales similares a las que se han reportado en humanos afectados por MC (Schmutzhard *et al.*, 2010). Las afectaciones de la frecuencia respiratoria se explican a partir de la presencia de secuestro de parásitos en el pulmón (Van der Heyde *et al.*, 2006) y debido a afectaciones del centro de regulación de la respiración que contribuyen a la dificultad respiratoria. Esta observación se corresponde con la localización de alteraciones patológicas en el tallo encefálico (Lackner *et al.*, 2006b).

En resumen, las alteraciones tempranas en los reflejos, el sistema sensorial y en el neurocomportamiento se asocian con un fenotipo de enfermedad cerebral de los animales infectados con PbA.

El análisis histopatológico cuantitativo post-mortem describe que el tamaño de la lesión hemorrágica en ratones con MCE es mayor en el rino encéfalo y tallo encefálico,

al comparar otras regiones del cerebro. MCE no es una encefalopatía difusa. La compresión debida al edema puede ser la causa del predominio de hemorragias en tallo encefálico, también los cambios en la hemodinámica pueden ser causantes de la ruptura capilar. Investigaciones anteriores indican la importancia de estimar la frecuencia de focos hemorrágicos ya que los ratones con síntomas neurológicos mostraron una destrucción diseminada de los pequeños vasos, mientras los ratones resistentes mostraron una inflamación intensa, pero solamente hemorragias focales. Se concluyó que la distribución y tamaño de la hemorragia influye en las manifestaciones clínicas en estados terminales de la enfermedad (Lackner *et al.*, 2006b), lo cual ha sido implementado en estudios posteriores (Dai *et al.*, 2010 y Bucher *et al.*, 2011).

### **Intervenciones quimoterapéuticas antimaláricas en el modelo de infección con *P. berghei* ANKA**

Las evaluaciones de las funciones cognitivas, sensoriales-motoras y de la conducta que utilizan protocolos bien establecidos como es el caso del SHIRPA son muy útiles para ayudar a establecer el estado clínico más amplio de los animales infectados. La presentación de signos clínicos bien reconocidos de MCE tales como la ataxia, la parálisis límbica, las convulsiones, la hipotermia de moderada a severa, la pérdida del reflejo postural y/o coma, han sido propuestos como guías en la decisión de aplicación de tratamientos en los protocolos experimentales, sin embargo estos signos generalmente aparecen en estados muy tardíos de la enfermedad, en pleno desarrollo de la MCE.

Bienvenu *et al.* (2008) han definido cinco estados de presentación clínica a las cuales los ratones pueden recibir tratamiento: sin síntomas (0), con signos de daño no específicos (1), con afectaciones motoras (2), con dificultad respiratoria (3) y con coma (4). Al seleccionar administrar la primera dosis de artesunato, de una combinación artesunato-eritropoyetina, en el día 6 post-infección, aproximadamente un 70% de los animales comenzaron el esquema en estados 1 y 2 y sobrevivieron la mayoría al ser tratados. Dosis repetidas de cloroquina a 20 mg/kg durante 10 días se iniciaron cuando los animales cumplían tres criterios: parasitemia mayor del 7%, actividad disminuida y una pérdida de peso mayor o igual al 2 % de la inicial y trajeron como resultado la no recrudescencia del parasitismo y no se produjeron las muertes por enfermedad severa, aunque persistieron algunas dificultades motoras producto de la manifestación previa de signos de MCE (Dai *et al.*, 2010). Wakinine-Grinberg *et al* (2010) reportaron que el artesunato que se administró durante 3 días a partir del día 6 postinfección a dosis dobles diarias de 5 mg/kg impidió significativamente el desarrollo de la MCE en la mayoría de los animales tratados y la muerte se produce por anemia una semana después que los controles sin MCE. También demostraron que a dosis menores (2 x 2,5 mg/kg) de artemisone no se produjo la MCE en los animales tratados y se retrasó la recrudescencia, mientras la cura se observó a 2 x 5 mg/kg. El tratamiento de la infección desde el día 5, cuando la parasitemia es moderada y en ascenso, pero los signos de MCE están ausentes, permite evaluar

la eficacia y rapidez en la eliminación de parásitos por el fármaco en estudio a diferentes dosis y cuáles de éstas previenen la recrudescencia.

Si el rescate se realiza posterior al día 6 post-infección, los animales se encuentran en condiciones variables y deberá estar acompañado de una evaluación clínica de cada uno de ellos a través de al menos seis pruebas tomadas del protocolo SHIRPA (excitación de transferencia, actividad locomotora, elevación de la cola, maniobra en alambre, reflejo postural de contacto y postura), de la medición de la temperatura rectal y de la observación de los signos clínicos mencionados de MCE. El tratamiento se aplica acorde la adecuada eficacia esquizotocida del fármaco determinada previamente, además permite evaluar las posibilidades de rescate en estados de pleno desarrollo de la MCE. Mediante el uso de esta estrategia de evaluación, se demostró que la administración de artemeter a 25 mg/kg y de artesunato a 32 mg/kg fueron efectivas en rescatar el 40% de los animales en fase avanzada de MCE (Clemmer et al., 2011).

En general, los derivados de artemisinina, además de su rápida acción antiparasitaria que ha sido comprobada en ensayos clínicos para el tratamiento de la malaria cerebral en humanos, han mostrado experimentalmente actividad reductora sobre las respuestas inflamatorias de células T CD4+ y CD8+ y actúan sobre el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Waknine-Grinberg et al., 2010). Sin embargo, en las pruebas clínicas se ha evidenciado alrededor de aún un 8% de mortalidad que no ha podido precisarse si se debe al subdiagnóstico de sepsis y neumonías en niños parasitados y motiva a que se mantenga el interés en el estudio de las causales y los medios para neutralizarlas. Las potencialidades adicionales de estos fármacos ofrecen una guía para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

## CONCLUSIONES

El modelo de infección de ratones susceptibles con *P. berghei* ANKA es una herramienta útil para el estudio de la fisiopatología de la malaria cerebral en humanos. Las causas y consecuencias del secuestro de células en vasos sanguíneos parecen ser muy similares en ambos síndromes, aunque el tipo de célula que es secuestrada en la MC humana o murina parece ser diferente. Se observó activación endotelial y disfunción, aumento de la expresión de moléculas de adhesión (eCAMs) en el cerebro y otros lechos vasculares que los hacen receptivos a la adhesión de leucocitos, las plaquetas o los eritrocitos infectados. Se pueden mencionar además como características similares: las microhemorragias, el edema y otros indicadores de vasculopatía severa. Las alteraciones tempranas en los reflejos, el sistema sensorial y en el neurocomportamiento se asocian con un fenotipo de enfermedad cerebral de los animales infectados con PbA. Por ello, la caracterización conductual precisa a través de protocolos experimentales y la descripción de los cambios histológicos, metabólicos e inmunológicos concomitantes pueden ser herramientas útiles para investigar las dianas y la efectividad de futuras intervenciones terapéuticas antimaláricas y de estrategias neuroprotectoras adjuntas. Esto deberá ir aparejado a

un aumento de la investigación de casos humanos que confirmen la eficacia del conocimiento adquirido a través de la experimentación con modelos animales.

## AGRADECIMIENTO

A la Dra Virginia Capó de la Paz y la Dra Lázara Rojas Rivero, por las recomendaciones a la redacción de este documento

## ABSTRACT

Models for cerebral malaria and their suitability for drug research

**Cerebral malaria is one of the most important complications of *Plasmodium falciparum* infections. Forty percent of the worldwide population is at risk of being infected of malaria. These infections produced approximately 243 millions of clinical cases and 863000 deaths in 2008, the majority of them are children under 5 years old from sub-Saharan Africa. Knowledge of the pathophysiology of cerebral malaria is a big task. At present, no model is capable to reproduce all aspects of the human disease, but murine models have been helpful tools. Among them, infection of susceptible hosts with the strain ANKA of *Plasmodium berghei* is the most widely used. Studies of experimental cerebral malaria are based on more than 20 years of research. This work reviewed the recent findings and selected the cardinal elements that support the relevance and operative performance of these models. In summary, it concludes that the use of precise behavioural characterization and description of concomitant histological, metabolic and immunological changes of existing models can become means for successful research on targets and efficacy of future therapeutic interventions.**

**Keywords:** Cerebral malaria. *Plasmodium berghei*. Disease models. Physiopathology. Antimalarials. Drug therapy.

## REFERENCIAS

- Amante FH, Stanley AC, Randall LM, Zhou Y, Haque A, McSweeney K, Waters AP, Janse CJ, Good MF, Hill GR, et al. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol.* 2007;171(2):548-59.
- Arévalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, Piñeros JG, Padilla N, Terrientes Z, Rosas A, et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta Trop.* 2012;121(3):303-14.
- Beghdadi W, Porcherie A, Schneider BS, Dubayle D, Peronet R, Huerre M, Watanabe T, Ohtsu H, Louis J, Mecheri S. Inhibition of histamine-mediated signaling confers significant protection against severe malaria in mouse models of disease. *J Exp Med.* 2008;205(2):395-408.
- Bienvenu A, Ferrandiz J, Kaiser K, Latour C, Picot S. Artesunate-erythropoietin combination for murine cerebral malaria treatment. *Acta Trop.* 2008;106(2):104-8.

- Birbeck GL, Beare N, Lewallen S, Glover SJ, Molyneux ME, Kaplan PW, Taylor TE. Identification of malaria retinopathy improves the specificity of the clinical diagnosis of cerebral malaria: findings from a prospective cohort study. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(2):231-4.
- Bucher K, Dietz K, Lackner P, Pasche B, Fendel R, Mordmüller B, Ben-Smith A, Hoffmann WH. *Schistosoma* co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2011;41(1):21-31.
- Calleri G, Behrens RH, Schmid ML, Gobbi F, Grobusch MP, Castelli F, Gascon J, Bisoffi Z, Jelinek T, Caramello P, et al. Malaria chemoprophylaxis recommendations for immigrants to Europe, visiting relatives and friends - a Delphi method study. *Malar J.* 2011;10:137.
- Camara B, Diagne-Gueye NR, Faye PM, Fall ML, Ndiaye JL, Ba M, Sow HD. Malaria severity criteria and prognostic factors among children in Dakar. *Med Mal Infect.* 2011;41(2):63-7.
- Carvalho LJ. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 2010;26(6):271-2.
- 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(4):1383-90.
- Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):165-71.
- Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, Desruisseaux MS. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microb Infection.* 2010;12(14-15):1198-1207.
- De Souza JB, Hafalla JCR, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology.* 2010;137(5):755-72.
- Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, Bojang K, Olaosebikan R, Anunobi N, Maitland K, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9753):1647-57.
- Fernández Calienes-Valdés A, Mendiola-Martínez J, Acuña-Rodríguez D, Scull-Lizama R, Gutiérrez-Gaitén Y. Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. *Rev Cub Med Trop.* 2011;63(2):181-185.
- Franke-Fayard B, Janse CJ, Cunha-Rodrigues M, Ramesar J, Buscher P, Que I, Lowik C, Voshol PJ, Den Boer MA, Van Duinen SG, et al. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2005;102(32):11468-73.
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annual Rev Pathol.* 2007;2:217-249.
- Hearn J, Rayment N, Landon DN, Katz DR, De Souza JB. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun.* 2000;68(8):5364-76.
- Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2006;36(5):569-582.
- Jennings VM, Lal AA, Hunter RL. Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. *Infect Immun.* 1998;66(12):5972-79.
- Lackner P, Beer R, Helbok R, Broessner G, Engelhardt K, Brenneis C, Schmutzhard E, Pfaller K. Scanning electron microscopy of the neuropathology of murine cerebral malaria. *Malar J.* 2006a;5:116.
- Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006b;32(2):177-88.
- Langhorne J, Buffet P, Galinski M, Good M, Harty J, Leroy D, Mota MM, Pasini E, Renia L, Riley E, et al. The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. *Malaria J.* 2011;10(1):23.
- Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):810-20.
- Martins YC, Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT. Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: Lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation.* 2009a;16(2):134-45.
- Martins YC, Smith MJ, Pelajo-Machado M, Werneck GL, Lenzi HL, Daniel-Ribeiro CT, Carvalho LJ. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int J Exp Pathol.* 2009b;90(2):119-30.
- Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BPT, Andrade BG, Souza TM, Souza DO, Daniel-Ribeiro CT. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malaria J.* 2010;9:85.
- McQuillan JA, Mitchell AJ, Ho YF, Combes V, Ball HJ, Golenser J, Grau GE, Hunt NH. Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 2011;41(2):155-63.

- Mendiola J, Hernández H, Sariego I, Rojas L, Otero A, Ramírez A, Chavez MA, Abreu J, Hernández. Antimalarial activity from three ascidians: an exploration of different marine invertebrate phyla. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(10):909-916.
- Msungeni HA, Kamugisha ML, Sembuche SH, Malecela EK, Akida JA, Temba FF, Mmbando BP, Lemnge MM. Prospective study on severe malaria among in-patients at Bombo regional hospital, Tanga, north-eastern Tanzania. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:256.
- Nie C Q, Bernard N J, Norman M U, Amante F H, Lundie R J, Crabb B S, Heath W R, Engwerda C R, Hickey M J, Schofield L, et al. IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(4):e1000369.
- Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Severe falciparum malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: S1-S90.
- Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Guidelines for the treatment of malaria. Ginebra: OMS; 2006.
- Organización Mundial de la Salud. World Malaria Report 2009. Ginebra: WHO Press; 2009.
- Perisse AR, Strickland GT. Usefulness of clinical algorithm as screening process to detected malaria in low-to-moderate transmission areas of scarce health related resources. *Acta Trop.* 2008;107(3):224-229.
- Peters W, Portus JH, Robinson BL. The chemotherapy of rodent malaria. XXII. The value of drug resistant strains of *Plasmodium berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69(2): 155-171.
- Plebanski M, Locke E, Kazura JW, Copel RL. Malaria vaccines: into a mirror, darkly? *Trends Parasitol.* 2008;24(12):532-6.
- Randall LM, Amante FH, Mcsweeney KA, Zhou Y, Stanley AC, Haque A, Jones MK, Hill GR, Boyle GM, Engwerda CR. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. *Infect Immun.* 2008;76(7):3312-20.
- Rénia L, Gruner AC, Snounou G. Cerebral malaria: in praise of epistemes. *Trends Parasitol* 2010; 26: 275-7.
- Rest, JR. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(3):410-5.
- Riley EM, Couper KN, Helmby H, Hafalla JCR, Brian de Souza J, Langhorne J, Jarra W, Zavala F. Neuropathogenesis of human and murine malaria. *Trends Parasitol.* 2010;26(6):277-8.
- Roca-Feltrer A, Carneiro I, Armstrong Schellenberg JR. Estimates of the burden of malaria morbidity in Africa in children under the age of 5 years. *Trop Med Int Health.* 2008;13(6):771-83.
- Roca-Feltrer A, Carneiro I, Smith L, Schellenberg JR, Greenwood B, Schellenberg D. The age patterns of severe malaria syndromes in sub-Saharan Africa across a range of transmission intensities and seasonality settings. *Malar J.* 2010;9:282.
- Rodríguez-Pérez M, Martínez JM, Rivero LR, Alvarez HMM, Valdéz AFC, Rodríguez DA, Lizama RS, Payrol JA. Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Rev Cienc Farm Básica Apl.* 2006;27(3):197-205.
- Rojas L. *Plasmodium*. Libro de Microbiología y Parasitología Médicas. v. III. Ciudad de La Habana: Editorial ECIMED; 2001.
- Schmutzhard J, Kositz CH, Lackner P, Dietmann A, Fischer M, Glueckert R, Reindl M, Stephan K, Riechelmann H, Schrott-Fischer A, et al. Murine malaria is associated with significant hearing impairment. *Malar J.* 2010;9:159.
- Togbe D, Schofield L, Grau GE, Schnyder B, Boissay V, Charron S, Rose S, Beutler B, Quesniaux VF, Ryffel B. Murine cerebral malaria development is independent of toll-like receptor signalling. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1640-8.
- Van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 2006; 22(11):503-8.
- Waknine-Grinberg J, Hunt N, Bentura-Marciano A, McQuillan J, Chan H, Chan W, Barenholz Y, Haynes R, Golenser J. Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J.* 2010;9:227.
- White NJ, Turner GDH, Medana IM, Dondorp AM, Day NPJ. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol.* 2009;26(1):11-15.
- WHO, World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Severe falciparum malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:S1-S90.

Recibido el 12 de diciembre de 2011.

Aceptado el 23 de mayo de 2012.

