

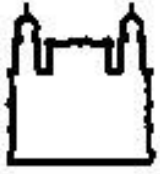


Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Tamires da Cunha Fernandes

**ROSUVASTATINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO DANO
COGNITIVO DECORRENTE DA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Rio de Janeiro
2020



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Tamires da Cunha Fernandes

**ROSUVASTATINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO DANO
COGNITIVO DECORRENTE DA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM).

Orientadores: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dr^a. Patricia Alves Reis.

Rio de Janeiro
2020



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Fernandes, Tamires da Cunha.

Rosuvastatina como estratégia terapêutica no dano cognitivo decorrente da malária cerebral experimental / Tamires da Cunha Fernandes. - Rio de Janeiro, 2020.

119 f.

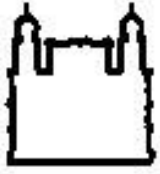
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientador: Hugo Caire de Castro Faria Neto.

Bibliografia: f. 85-102

1. Malária cerebral. 2. Neuroinflamação. 3. Rosuvastatina. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular

Tamires da Cunha Fernandes

**ROSUVASTATINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO DANO
COGNITIVO DECORRENTE DA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Orientadores: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dr^a. Patricia Alves Reis.

Data da defesa: 12 de março de 2020.

Componentes da Banca Examinadora:

Dr. Daniel Pedra Adesse – IOC – FIOCRUZ/RJ

Dr.^a Cecília Hedin Pereira – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/RJ

Dr. Eugênio Damaceno Hottz – Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF/MG

Rio de Janeiro
2020

Dedico esse trabalho à minha família, que tanto me incentivou e me apoiou ao longo do curso desse projeto e amadurecimento profissional.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus, pois sem Ele eu nada seria. Agradeço por sua infinita fidelidade e misericórdia que me guiaram e me deram fôlego para prosseguir;

À minha orientadora Dr. Patricia Reis, que eu tanto admiro como pessoa e pesquisadora, por todo apoio, confiança, respeito e amizade. Obrigada por ter tido sempre o grupo e os braços abertos pra mim quando eu mais precisei, o que foi fundamental para que a “janelinha” da malária fosse aberta no meu coração. Em troca, espero ter sido digna de orgulho;

Ao meu orientador Dr. Hugo Caire, por todo apoio e ensinamentos. Obrigada pelo acolhimento no laboratório desde a minha iniciação científica;

Aos meus pais, Sandra e Mauricio, que não duvidaram de mim em nenhum momento e me apoiaram em cada decisão muito mais do que eu podia imaginar. Por vocês eu sou impulsionada a crescer e demonstrar cada vez mais o meu melhor;

Ao melhor irmão do mundo, Caio, por toda a admiração que sentia por mim a cada tentativa de explicar qualquer assunto biológico, por me animar em dias frustrantes e cansativos e pelo seu enorme companheirismo;

À doutoranda Tathiany Igreja, por ter sido mais que uma amiga de grupo. Foi uma honra sem tamanho ter te conhecido e me aproximado mais de você. Com seu coração enorme e seu cérebro maior ainda me pegou pela mão e embarcou comigo no que foi preciso. Frente a tanto incentivo era impossível não acreditar em mim;

Ao meu grupo, em especial, Millena Pais, Júlia Maria e Emílio Telles. Obrigada pela amizade sincera, pelas discussões científicas, pelas múltiplas mãos na bancada, pela companhia e por sempre se mostrarem tão solícitos com relação a tudo;

À todos os integrantes do Laboratório de Imunofarmacologia, por terem me acolhido tão bem e por todos os momentos maravilhosos que faziam horas de experimento se tornarem minutos;

À secretária do laboratório de Imunofarmacologia, Rose Branco, sempre

tão solícita e pronta a ajudar frente à qualquer que fosse o problema administrativo ou não;

Ao Dr. Leonardo Carvalho, por ter aceitado tão prontamente o convite como revisor e suplente deste trabalho;

À Dr^a. Cecilia Hedin, Dr. Eugênio Hottz e Dr. Daniel Adesse pela confiança e gentileza por terem aceitado o convite de serem parte integrante da Banca Examinadora desse trabalho;

Aos demais amigos e, em especial, meu namorado, Mateus, que compartilharam comigo esse momento, foram pacientes quanto a minha ausência e me ajudaram bastante com dicas e apoio para o desenvolvimento desse trabalho;

Meu agradecimento especial para a Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, bem como toda a forma de fomento, sem os quais não seria possível a execução do presente trabalho.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

Lista de abreviaturas

- μL – Microlitros
- AKT – Proteína Quinase B
- AMA-1 – *Apical Membrane Antigen-1*
- AMPA – α -Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico
- Ang – Angiopietina
- AVC – Acidente Vascular Cerebral
- BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
- BHE – Barreira Hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*)
- Ca – Cálcio
- CaMKII – Proteína Cálcio Calmodulina Kinase 2
- CIDR – *Cysteine-Rich Interdomain Region*
- CO – Monóxido de Carbono
- CSP – *Circumsporozoite Protein*
- DMAPP – *Dimethylallyl Pyrophosphate*
- DNA – Ácido Desorribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- EBL – *Erythrocyte Binding-Like Proteins*
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- eNOS - Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (*Endothelial Nitric Oxide Sintase*)
- EPCR – *Endothelial Protein C Receptor*
- Erk – *Extracellular Signal-Regulated Kinases*
- GAP – Proteínas Ativadoras de GTPase
- GDI – Inibidores e Dissociação de Nucleotídeos Guanina
- GDP – Guanosina Difosfato
- GEF – Fatores de Troca de Nucleotídeo Guanina
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- GTP – Guanosina Trifosfato
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
- HMG Co-A – *3-Hydroxy-3MethylGlutaryl-CoA*
- HMGR - HMG Co-A Redutase (*3-Hydroxy-3MethylGlutaryl-CoA Reductase*)

HNE – *Hydroxynonenal*

HSPG – *Higher Sulfated Forms of Heparin Sulfate Proteoglycans*

HTAB – Brometo de Cetildimetilamônio

IC50 – *Half Maximal Inhibitory Concentration*

ICAM-1 – Moléculas de Adesão Intracelular – 1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*)

IFN– Interferon

IL – Interleucina

iNOS – Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (*Inducible Nitric Oxide Sintase*)

IPA – Índice Parasitário Anual

IPP – *Isopentenyl Pyrophosphate*

K – Potássio

KHARP – *Knob Associated Histidine Rich Protein*

Ki – Constante de Equilíbrio de Dissociação

LDH – Lactato Desidrogenase

LTD – Depressão de Longa Duração

LTP – Potenciação de Longa Duração

MAPK - MAP Quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases*)

MC – Malária Cerebral

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

M-CSF – Fator Estimulador de Crescimento de Colônia de Macrófagos

Mg – Magnésio

mGLuR – Receptores Metabotrópicos de Glutamato (*Metabotropic Glutamate Receptor*)

MPO – Mieloperoxidase

MSP – *Merozoite Surface Protein*

Na – Sódio

NADPH-oxidase – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*)

NET – Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (*Neutrophils Extracellular Traps*)

ng – Nanogramas

NLR – Receptores do Tipo NOD (*NOD Like Receptors*)

nM – Nanomolar

NMDA – N-Metil-D-Aspartato (*N-Methyl-D-Aspartate*)

nNOS - Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal (*Neuronal Nitric Oxide Sintase*)
NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)
NR2B – *N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subtype 2B*
NT-3 – *Nitrotyrosine - 3*
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PAI-1 – *Plasminogen Activator Inhibitory 1*
PAMP – Padrão Molecular Associado ao Parasita
PbA- *Plasmodium berghei ANKA*
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PfEMP1 – *Plasmodium falciparum Erythrocyte Protein 1*
PfHPR2 – *Histidine-Rich Protein 2*
PfRH – *P. falciparum Reticulocyte-Binding Protein Homologs*
pg – Picogramas
PI3K – *Phosphoinositide 3-Kinase*
PKA – Proteína Quinase A
PKC – Proteína Quinase C
PRR – Receptores de Reconhecimento de Padrões
PSD-95 – *Postsynaptic Density 95*
RBC – *Red Blood Cells*
RLR – Receptores do Tipo RIG-1 (*RIG-1 Like Receptors*)
RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio (*Nitrogen Reactive Species*)
RON - *Rhoptry Neck proteins*
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
RPM – Rotações por minuto
RTD – Testes de Diagnóstico Rápido (*Rapid Test Diagnostic*)
S100β – *S100 Calcium-Binding Protein β*
SHIRPA - *SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital Phenotype Assessment*
SNC – Sistema Nervoso Central
SPECT – *Sporozoite Microneme Protein Essential for Traversal*
Src – *Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase*
SynGAP – *Synaptic Ras GTPase-Activating Protein*

TLR – Receptores do Tipo Toll

TMB - 3,3'-5,5' *Tetrametilbenzidina*

TNF– Fator de Necrose Tumoral

t-PA – *Tissue-Type Plasminogen Activator*

TRAP – *Thrombospondin-Related Anononymous Protein*

TrkB – *Tropomyosin Receptor Kinase B*

TSR – *Type I Thrombospondin Repeat*

VCAM-1 – Moléculas de Adesão Vasculares – 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

WHO/ OMS – *World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde*

Resumo

A malária é uma doença infecciosa parasitária de abrangência mundial. A Malária Cerebral (MC) é a complicação mais grave e letal da infecção desencadeada pelo *Plasmodium falciparum*. Esse quadro grave, consequente da adesão de hemácias parasitadas e não parasitadas, além de leucócitos, nos capilares cerebrais, leva a inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), além da disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), ativação de astrócitos e de microglia, levando ao desenvolvimento de danos celulares irreversíveis, culminando com o dano cognitivo. As estatinas estão se tornando cada vez mais alvos de pesquisas farmacológicas. Apesar de comumente usados para o controle de dislipidemias e doenças cardiovasculares, evidências crescentes têm demonstrado que, devido a ação anti-inflamatória, antioxidante e anti-excitotóxica neuronal esses fármacos poderiam ser capazes de modular a neuroinflamação. O presente estudo esteve focado na avaliação, em particular da rosuvastatina, que já demonstrou efeito anti-inflamatório em quadros de doenças infecciosas sistêmicas e proteção em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Avaliamos o efeito da rosuvastatina na reversão do dano cognitivo consequente da MC, focando na neuroinflamação e na sinalização celular associada aos processos mnemônicos. Para isso, camundongos machos C57BL/6 (L. 025/2015) foram previamente inoculados com *P. berghei* ANKA (PbA). A partir dos primeiros sintomas de MC, foi realizado o tratamento com rosuvastatina (10-20 mg/kg v.o.). Para a análise cognitiva, os animais foram tratados em conjunto com o antimalárico cloroquina (25 mg/kg v.o.) do sexto ao décimo segundo dia pós infecção. O tratamento com rosuvastatina não reduziu a carga parasitária, o desenvolvimento de malária grave e a mortalidade dos animais, porém reverteu o desenvolvimento de dano cognitivo nos animais infectados tratados com 10 mg/kg em conjunto com a cloroquina. Ainda foram avaliados aspectos condizentes com a neuroinflamação e neurodegeneração. O tratamento com rosuvastatina foi capaz de reverter significativamente níveis séricos e teciduais de IFN- γ e de TNF- α frente à infecção, além de diminuir os níveis de MPO, subprodutos da nitrosilação de proteínas e peroxidação lipídica (3-nitrotirosina e 4-hidroxinonenal, respectivamente). O tratamento com rosuvastatina preveniu a disfunção da BHE, verificado pelo extravasamento do corante Azul de Evans, bem como os perfis de microgliose, através da expressão de Iba-1, e astrogliose, através da marcação de GFAP e S100 β . Verificamos que a infecção com PbA promoveu um desbalanço das funções sinápticas a partir de uma alta expressão de PSD-95 e sinaptofisina, proteínas pós e pré-sinápticas, que foi revertido por rosuvastatina, bem como a alta fosforilação de Erk 1/2. Assim, nota-se que rosuvastatina desempenhou papel neuroprotetor e anti-inflamatório frente à MC, prevenindo as sequelas cognitivas a partir da prevenção do surgimento do dano tecidual, oferecendo sustentação para estratégias terapêuticas frente à disfunção neurocognitiva.

Palavras-chave: Malária Cerebral; Neuroinflamação; Rosuvastatina.

Abstract

Malaria is a worldwide infectious parasitic disease. Cerebral Malaria (CM) is the most serious and lethal complication of infection caused by *Plasmodium falciparum*. The adhesion of parasitized and non-parasitized erythrocytes and leukocytes in the cerebral capillaries leads to inflammation, reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (NOS) production, as well as the blood-brain barrier (BBB) breakdown, astrogliosis and microgliosis, which leads to irreversible cellular damage and cognitive impairment. Statins are increasingly targeted by pharmacological research. Despite commonly has being used for dyslipidemias and cardiovascular diseases, increasing evidences has shown that due to anti-inflammatory, antioxidant and anti-excitotoxic effects these drugs could be able to modulate neuroinflammation. The present study focused on the evaluation, in particular of rosuvastatin, which has already demonstrated an anti-inflammatory effect in cases of systemic infectious diseases and protection in experimental models of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's. We evaluated the effect of rosuvastatin in reversing cognitive impairment resulting from CM, focusing on neuroinflammation and cell signaling associated with mnemonic processes. For this, male C57BL/6 mice (L. 025/2015) were previously inoculated with *P. berghei* ANKA (PbA). From the first symptoms of CM, treatment with rosuvastatin (10-20 mg/kg o.) was performed. For the cognitive analysis, the animals were treated together with the chloroquine antimalarial (25 mg/kg o.) from the sixth to the twelfth day after infection. Treatment with rosuvastatin did not reduce the parasitic burden, the development of severe malaria and the mortality of the animals, but reversed the development of cognitive damage in infected animals treated with 10 mg/kg in conjunction with chloroquine. Aspects consistent with neuroinflammation and neurodegeneration were also evaluated. Treatment with rosuvastatin was able to significantly reverse serum and tissue levels of IFN- γ and TNF- α against infection, in addition to decreasing levels of MPO, protein nitrosylation by-products and lipid peroxidation (3-nitrotyrosine and 4-hydroxynonenal, respectively). The treatment with rosuvastatin prevented BBB dysfunction, verified by the leakage of Evan's Blue dye, as well as the microgliosis profiles, through the expression of Iba-1, and astrogliosis, through the GFAP and S100 β marking. We found that PbA infection promoted an imbalance of synaptic functions based on a high expression of PSD-95 and synaptophysin, post and pre-synaptic proteins, which was reversed by rosuvastatin, as well as high phosphorylation of Erk 1/2. Thus, it is noted that rosuvastatin played a neuroprotective and anti-inflammatory role against CM, preventing cognitive sequelae from preventing the onset of tissue damage, offering support for therapeutic strategies in the face of neurocognitive dysfunction.

Key words: Cerebral Malaria; Neuroinflammation; Rosuvastatin.

Sumário

Resumo	xiii
Abstract.....	xiv
Introdução.....	1
1. <i>Malária</i>	1
1.1 <i>Epidemiologia e transmissão</i>	1
1.2 <i>Ciclo do Plasmodium spp</i>	4
1.3 <i>Sintomatologia e tratamento</i>	9
2. <i>Malária Cerebral (MC)</i>	11
2.1 <i>Fisiopatologia da MC</i>	12
2.2 <i>Função cognitiva</i>	19
3. <i>Estatinas</i>	24
3.1 <i>O papel das estatinas na neuroinflamação</i>	28
Justificativa.....	32
Objetivos	33
1. <i>Objetivo geral</i>	33
2. <i>Objetivos específicos</i>	33
Material e métodos	34
1. <i>Animais</i>	34
2. <i>Manutenção das cepas e infecção dos animais</i>	34
3. <i>Avaliação da parasitemia</i>	35
4. <i>Avaliação do escore clínico de gravidade da doença</i>	35
5. <i>Grupos experimentais e tratamento</i>	36
6. <i>Avaliação do edema cerebral através de injeção retro-orbital (Ensaio de Azul de Evans)</i>	36
7. <i>Coleta das amostras</i>	37

7.1	<i>Punção ocular para obtenção de sangue</i>	37
7.2	<i>Perfusão extracorpórea para obtenção do tecido cerebral</i>	37
8.	<i>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) cerebral</i>	38
9.	<i>Processamento das amostras cerebrais para os ensaios bioquímicos e moleculares</i>	38
9.1	<i>Dosagem de proteínas (método BCA)</i>	39
10.	<i>Dosagem de citocinas através de ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA)</i>	39
11.	<i>Western blotting (WB)</i>	40
12.	<i>Dot blot (DB)</i>	41
13.	<i>Testes comportamentais</i>	42
13.1	<i>Freezing</i>	42
13.2	<i>Labirinto Aquático de Morris (Water maze)</i>	42
14.	<i>Análises Estatísticas</i>	43
	Resultados	44
1.	<i>Rosuvastatina não foi capaz de diminuir a carga parasitária dos animais infectados com PbA e não impede o desenvolvimento da MC</i>	44
2.	<i>Rosuvastatina a 10 mg/kg reduz a permeabilidade da BHE ocasionada pela infecção com PbA</i>	46
3.	<i>Rosuvastatina diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro e hipocampo de animais com MC.</i>	47
4.	<i>Rosuvastatina diminui a atividade de mieloperoxidase no cérebro de animais com MC</i>	50
5.	<i>Rosuvastatina é responsável pela reversão da microgliose e astrogliose nesse modelo de MC</i>	51
6.	<i>Rosuvastatina atua na inibição do estresse oxidativo no hipocampo e córtex de animais infectados com PbA</i>	55
7.	<i>Rosuvastatina diminui os níveis de pRac 1 no hipocampo de animais com MC</i> ..	58

8. <i>Rosuvastatina diminui a expressão de nNOS no cérebro de animais infectados com PbA</i>	60
9. <i>Rosuvastatina tem efeito neuroprotetor no modelo de MC experimental</i>	61
10. <i>No hipocampo, rosuvastatina normaliza os níveis de proteínas pré e pós-sinápticas na MC</i>	63
11. <i>A terapia combinada do antimalárico com rosuvastatina evita o comprometimento da cognição dos animais com MC</i>	65
12. <i>15 dias após a infecção com PbA os níveis das proteínas pré e pós-sinápticas retornam a seu estado basal no cérebro dos animais</i>	68
13. <i>Animais infectados e tratados com antimalárico e rosuvastatina exibem níveis basais de Rac 1 após 15 dias</i>	70
14. <i>Animais infectados e tratados com antimalárico e rosuvastatina exibem níveis aumentados de BDNF após 15 dias</i>	72
Discussão	74
Conclusões	82
Perspectivas	83
Referências bibliográficas	84

Introdução

1. Malária

A malária é uma importante infecção parasitária em seres humanos de abrangência mundial e é sinônimo de grande preocupação no âmbito da saúde pública, uma vez que está presente em mais de 97 países ao redor do mundo, representando risco à saúde a cerca de 3,3 bilhões de pessoas. Esta enfermidade costumava prevalecer no mundo todo, porém, foi eliminada dos EUA, Canadá, Europa e Rússia. Desde então, tem prevalecido em países tropicais, onde no ano de 2018 foram registrados cerca de 228 milhões de casos e 405 mil óbitos (COWMAN *et al.*, 2016; NICHOLAS J WHITE *et al.*, 2013; WHO, 2019).

1.1 Epidemiologia e transmissão

Na maioria dos casos, a transmissão da malária ocorre através da picada de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*. Existem mais de 400 espécies diferentes de mosquitos deste gênero e cerca de 30 desempenham o papel de vetores da malária. A intensidade da transmissão da doença está relacionada a fatores que dizem respeito ao parasita, ao mosquito vetor, ao hospedeiro humano e ao ambiente no qual estão inseridos. A transmissão da malária é mais efetiva e mais intensa em locais onde o ciclo de vida do mosquito é mais longo, o que favorece o completo desenvolvimento do parasita no interior do mosquito vetor até que ele esteja maduro o suficiente para a infecção de um hospedeiro, bem como em locais onde o repasto sanguíneo em humanos seja favorecido (COWMAN *et al.*, 2016; WHO, 2019). Além disso, as condições climáticas tem efeito diretamente na taxa de sobrevivência dos mosquitos, como o regime de chuvas, temperatura média anual e a umidade relativa do ar. A transmissão geralmente é dada numa dinâmica sazonal e é concentrada nas regiões situadas entre os trópicos (**Figura 1**) (WHO, 2019).

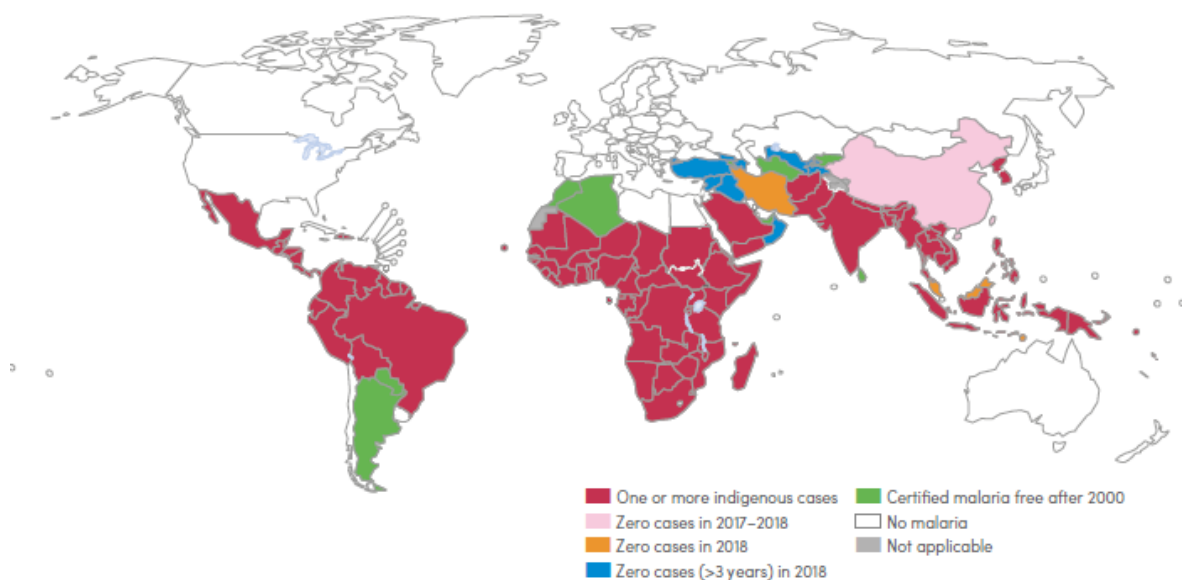


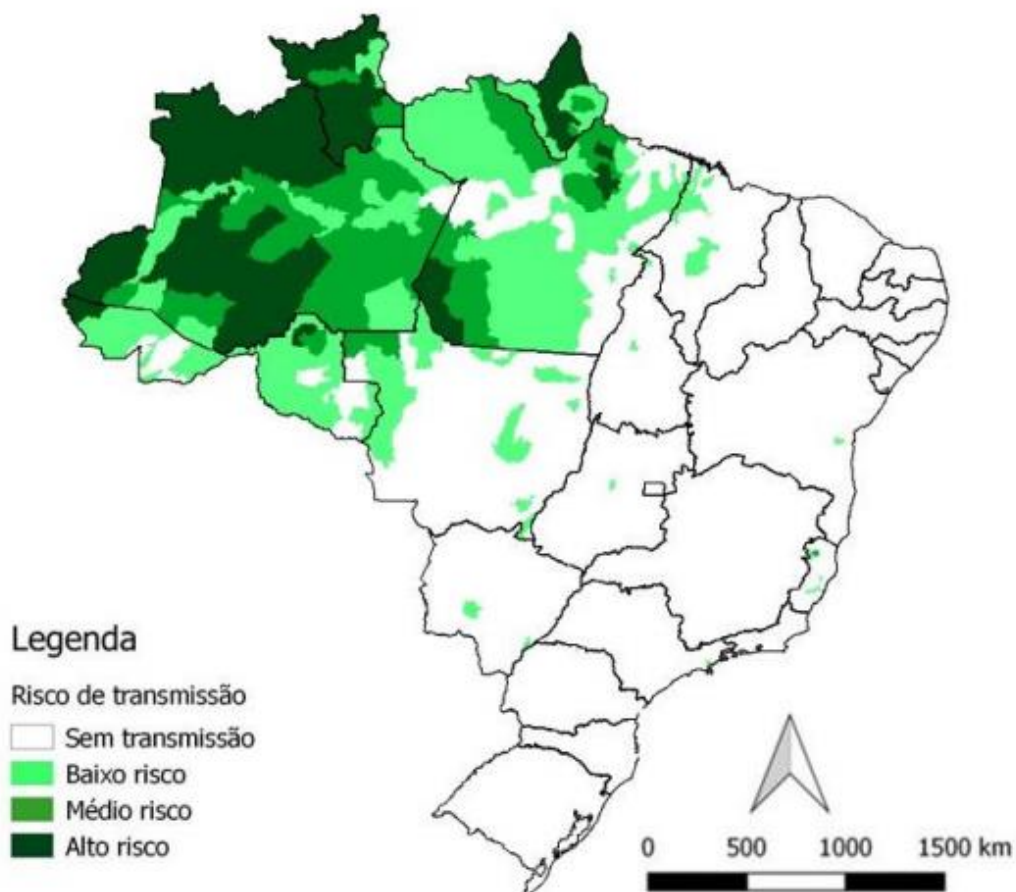
Figura 1: Mapa mundial da ocorrência de casos de malária (casos/1000 população sob risco de contrair a doença). *World Malaria Reports (WHO), 2019.*

No ano de 2018, aproximadamente metade de todos os casos da doença se concentraram em 6 países: Nigéria (25%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%) e Níger (4%). De forma geral, a região da África detém mais de 90% de todos os casos mundiais da doença. De acordo com o mais recente *World malaria report*, publicado em dezembro de 2019, a região da África, principalmente da África Subsaariana, continua a liderar a quantidade de pessoas acometidas por malária quando comparada com outras regiões do globo, totalizando cerca de 93% dos casos, seguida pelo Sudeste da Ásia (3,4%), a região leste do Mediterrâneo (2,1%) e as regiões da América Central e Sul (1,5%) (**Figura 1**) (WHO, 2019).

No Brasil, a maioria dos casos de malária concentra-se na área da Amazônia Legal, que abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. No ano de 2018, do total de 194 mil casos que foram notificados em todo o país, cerca de 99% se concentraram nessa região. A classificação das áreas de transmissão, no Brasil, ocorre de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), sendo de alto risco aqueles municípios com $IPA \geq 50$ casos/1000

habitantes, de médio risco os que possuem IPA entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco aqueles com menos de 10 casos/1000 habitante e sem risco as áreas com IPA menor de 1 caso/1000 habitantes (**Figura 2**).

Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2018.



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração.

Figura 2: Mapa de risco da malária por município de infecção, no Brasil. Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS, 2019.

Ainda de acordo com o *World malaria reports*, publicado em 2019, a taxa de redução de mortes ocasionadas pela malária no período de 2016 a 2018 foi estatisticamente menor do que a observada no período de 2010 a 2015. Do total de 228 milhões de casos de malária registrados mundialmente em 2018, cerca de 405 mil

evoluíram para o óbito. Em áreas com alta transmissão de malária, crianças com menos de cinco anos são particularmente suscetíveis à infecção, doença e morte. Cerca de dois terços (67%) de todas as mortes por malária ocorreram nessa faixa etária, a qual registrou, no ano de 2018, aproximadamente 272 mil casos de óbito.

Algumas espécies do gênero *Plasmodium spp.* causam a doença em seres humanos. São elas: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, que juntos reportam o maior número de casos; *Plasmodium ovale*; *Plasmodium malariae*, em partes do sudeste da Ásia, *Plasmodium knowlesi* e, mais recentemente no Brasil, *Plasmodium simium* (COWMAN *et al.*, 2016; WHO, 2019).

Das espécies responsáveis por causar malária em humanos, *P. falciparum* é a mais letal e responsável pelo acometimento severo da doença, principalmente na África. No ano de 2018, foi responsável por 99,7% de todos os casos de malária somente na região da África, 50% dos casos no Sudeste da Ásia e 71% dos casos na região do Mediterrâneo e 65% dos casos na região costeira do Oeste Pacífico. Ainda que a maioria das mortes seja causada pela malária transmitida pelo *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium vivax* também pode exercer papel causador de mortalidade, principalmente quando infecta mulheres grávidas, gerando, assim, aborto e má formação do feto, o que influencia na mortalidade infantil. Além disso, ele é mais distribuído geograficamente e é o parasita que predomina na região das Américas, contabilizando cerca de 75% de todos os casos nessa região e 47% dos casos ao redor do mundo (COWMAN *et al.*, 2016; WHO, 2019).

1.2 Ciclo do *Plasmodium spp.*

O agente causador da malária é o protozoário do gênero *Plasmodium spp.*, parasita unicelular pertencente ao filo Apicomplexa, que é transmitido através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Os parasitas da malária se proliferam através de inúmeras invasões repetitivas no interior das células sanguíneas de seus hospedeiros mamíferos, onde se multiplicam. O ciclo assexuado é responsável pela manifestação clínica, ou seja, sintomática e pela patogênese da malária. Durante a proliferação assexuada, alguns parasitas passam por um processo que envolve a

diferenciação e a maturação dos gametócitos na circulação sanguínea periférica do hospedeiro, o que se denomina ciclo sexuado, precedendo a ingestão pelo mosquito. Porém, ainda que o ciclo sexuado dos parasitas não contribua para a patogênese da malária, ele é essencial para a transmissão da mesma através de mosquitos que funcionarão como vetores da doença (NIZ *et al.*, 2018).

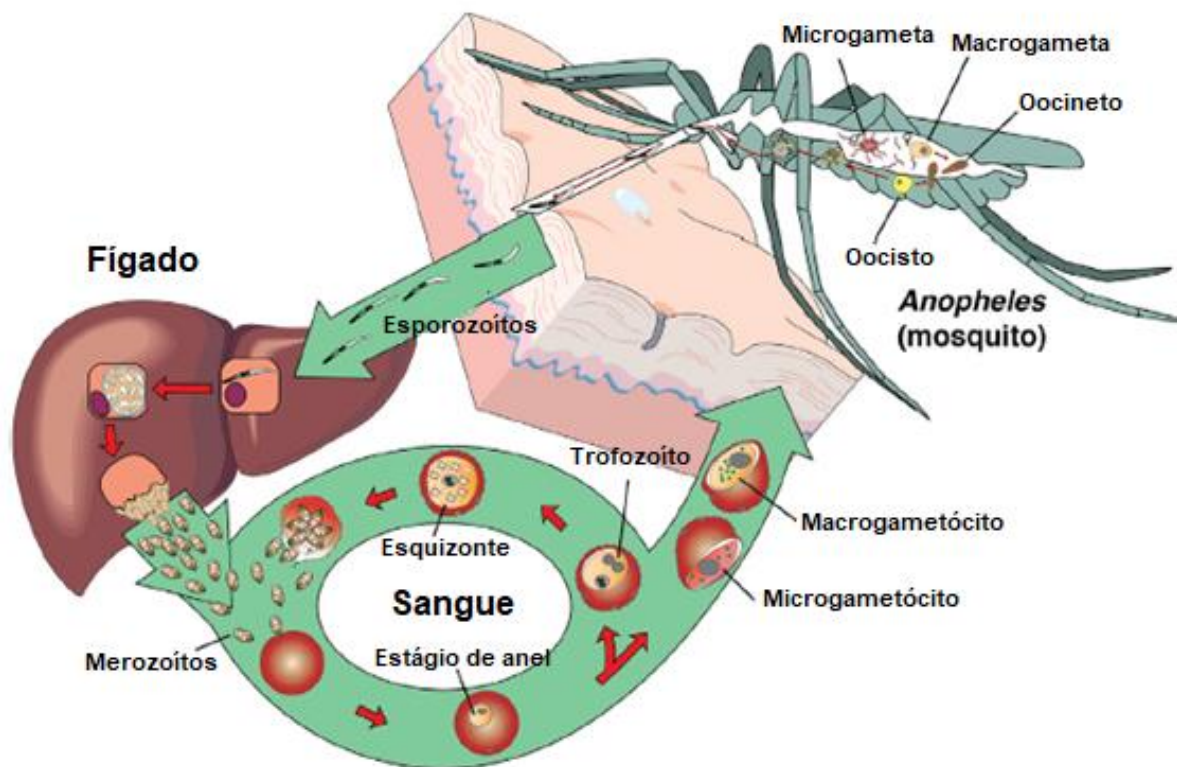


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* em hospedeiro humano. A malária inicia-se através da infecção por formas esporozoítas do parasita injetadas no hospedeiro por meio da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Esses esporozoítos migram para o fígado e, posteriormente invadem os hepatócitos onde se multiplicam gerando os merozoítos que evadem como formas esquizontes na corrente sanguínea onde invadem hemácias. No interior das hemácias, se desenvolvem em estágios que compreendem formas de anel, trofozoíta e esquizonte, gerando mais formas merozoítas que invadem novas hemácias e dão continuidade para o ciclo assexuado do parasita. Uma pequena porção dos parasitas se desenvolve em micro e macrogametócitos, as formas sexuadas do parasita que alcançam a derme e são internalizados por mosquitos em um novo repasto sanguíneo. No intestino do mosquito originam o zigoto, depois os oocinetos e, posteriormente, a forma de oocisto, do qual esporozoítos são liberados e migram para as glândulas salivares do mosquito. Adaptado de COWMAN *et al.*, 2017.

O ciclo de vida do *Plasmodium spp.* envolve dois tipos diferentes de hospedeiros: o vetor e o hospedeiro definitivo, ou seja, o mosquito e o homem, respectivamente (COWMAN *et al.*, 2017). Durante o repasto sanguíneo, há a inoculação de esporozoítos que infectam primeiramente as células hepáticas, onde se multiplicam, dando origem a esquizontes, contendo inúmeras formas merozoítas que são liberadas a partir da ruptura do hepatócito (**Figura 3**). Os esporozoítos acessam os hepatócitos através de um processo que envolve a travessia de uma barreira sinusoidal de células endoteliais fenestradas e células de Kupffer (TAVARES *et al.*, 2013), o qual é auxiliado por proteínas da família SPECT (*Sporozoite microneme protein essential for traversal*); SPECT2; entre outras (ISHINO *et al.*, 2004; RISCO-CASTILLO; TOPC, 2015). Ainda que o papel dessas proteínas não esteja completamente elucidado, estudos sugerem que a partir da formação de um complexo proteico de ataque à membrana elas estejam relacionadas com a internalização das formas esporozoítas nos hepatócitos. Além disso, estudos demonstram que a proteína SPECT2 está envolvida na formação de um vacúolo que auxilia no processo de travessia dessas formas até o fígado (RISCO-CASTILLO; TOPC, 2015). O reconhecimento dos hepatócitos pelas formas esporozoítas acontece por meio da interação com HSPGs (*Higher sulfated forms of heparin sulfate proteoglycans*), proteoglicanos de heparan sulfato expressos na superfície dessas células com a proteína CSP (*Circumsporozoite protein*), a qual circunda o esporozoíto (COPPI *et al.*, 2008; HERRERA *et al.*, 2015). Essa interação expõe o domínio TSR (*Type I thrombospondin repeat*) e proteínas como TRAP (*Thrombospondin-related anonymous protein*) e AMA-1 (*Apical membrane antigen-1*) são recrutadas (HERRERA *et al.*, 2015).

Após a ruptura das células hepáticas, os merozoítos, células com um formato ovalado com uma proeminência apical próprias para a invasão de hemácias, são lançados na corrente sanguínea infectando novas hemácias. Os merozoítos expressam adesinas na sua proeminência apical, bem como organelas secretoras, tais como as roptrias e micronemas, responsáveis pela ligação específica com hemácias de modo a promover uma série de eventos moleculares que culminam na invasão do parasita (**Figura 4A**) (COWMAN *et al.*, 2017; THAM; BEESON; RAYNER, 2017).

As formas merozoítas e esporozoítas são unicamente adaptadas para a invasão de hemácias e hepatócitos, respectivamente. Essas formas são restritas à invasão dessas células (COWMAN *et al.*, 2017). Os merozoítos de *P. falciparum*, *P. knowlesi* e

P. malariae preferencialmente invadem hemácias maduras, comumente chamadas de normócitos. *P. falciparum* e *P. knowlesi* também podem invadir hemácias jovens, chamadas reticulócitos, de forma facultativa, contrastando com *P. vivax* e *P. ovale* que são mais restritos quanto à invasão somente dessas células (LIM, CAEUL *et al.*, 2013; LIM, CAEUL *et al.*, 2016; MOON *et al.*, 2016). A população de reticulócitos representa cerca de 1% de todas as hemácias contidas na corrente sanguínea, sendo assim, a preferência de *P. vivax* por esse tipo celular demonstra relação direta com a reduzida carga parasitária observada na infecção desempenhada por esse parasita em humanos, principalmente quando comparado com a infecção por *P. falciparum*, o qual é muito menos restrito ao tipo celular que infecta, podendo alcançar altas cargas parasitárias (CHAN; DIETRICH; NGUITRAGOOL, 2020; COWMAN *et al.*, 2017). Porém, devido à sua habilidade de se manter latente em forma de hipnozoíto no interior de hepatócitos, *P. vivax* e *P. ovale* significam um desafio no que diz respeito a eliminação da malária, uma vez que essas formas contribuem para a recaída dos hospedeiros uma vez infectados (COWMAN *et al.*, 2017).

A invasão da hemácia do hospedeiro é dividida comumente em três partes: a pré-invasão; a interação apical e invasão; e equinocitose, ou seja, processo que acarreta na irregularidade da membrana das hemácias e formação de espículas regularmente distribuídas, e posterior recuperação da integridade da membrana (**Figura 4B**) (COWMAN *et al.*, 2017). As proteínas MSPs (*Merozoite surface protein*) desempenham papel fundamental na pré-invasão. MSP1 é responsável por formar amplos complexos proteicos que funcionam como uma plataforma na superfície do merozoíto a partir de sua associação com o glicosilfosfatidilinositol (GPI) do hospedeiro (COWMAN *et al.*, 2016, 2017). Para *P. falciparum*, essa etapa envolve a ligação das proteínas EBL (*Erythrocyte binding-like proteins*) e PfRHs (*P. falciparum reticulocyte-binding protein homologs*). A etapa de invasão propriamente dita tem início a partir da formação de junções oclusivas entre proteínas do parasita e proteínas da superfície da hemácia, principalmente AMA-1 e RON2 do complexo RON (BESTEIRO; DUBREMETZ, 2011). O conteúdo lipídico da própria também contribui para a formação do vacúolo parasitóforo que favorece a propulsão do merozoíto para o interior da hemácia (RIGLAR *et al.*, 2011). Após o fim da efetiva invasão das formas merozoítas, há a fusão da membrana da hemácia e recuperação da sua integridade. Todo esse processo de internalização e interação com

proteínas do parasita, principalmente PfrHs, causam o influxo de Ca^{2+} nas hemácias, o que ocasiona a equinocitose (WEISS *et al.*, 2015).

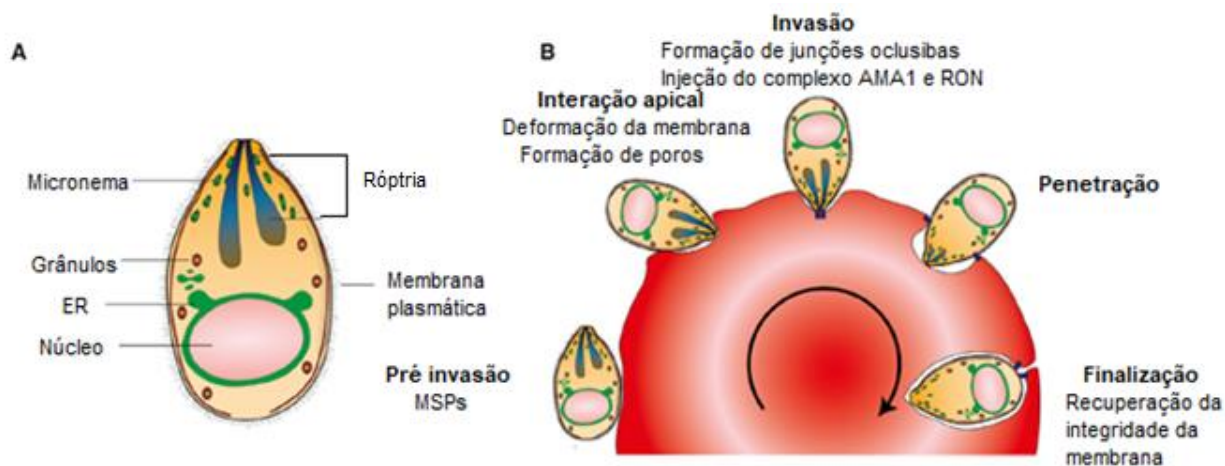


Figura 4: Estrutura do merozoíto e passos da interação com a hemácia do hospedeiro. A) Estrutura subcelular de um merozoíto mostrando o micronema e a róprias apicais. **B)** Etapas da invasão do merozoíto em uma hemácia do hospedeiro. A invasão da hemácia compreende as etapas de pré invasão, interação apical e invasão propriamente dita. Adaptado de COWMAN *et al.*, 2017.

Após a sua invasão em uma nova hemácia, o merozoíto se multiplica, dando origem a cerca de 16 a 32 novos merozoítos. Esse ciclo denomina-se ciclo eritrocítico ou assexuado. No ciclo eritrocítico, o parasita adquire a forma de anel ou trofozoíta jovem que amadurece, gerando trofozoítas maduros que atingirão uma fase de proliferação em número, gerando esquizontes. Ao final do ciclo, a membrana celular da hemácia se rompe liberando a forma proliferativa que é capaz de infectar outras hemácias saudáveis reiniciando assim o ciclo (CHAN; DIETRICH; NGUITRAGOOL, 2020) (**Figura 3**).

No hospedeiro, durante cada ciclo de replicação assexuada do parasita, uma pequena porção (cerca de 0,1% a 5%) se desenvolve em formas sexuadas masculinas e femininas, denominados gametócitos (SINDEN, 1983). Esse estágio contribui para a transmissão através dos vetores, os mosquitos. A maturação dos gametócitos ocorre de forma diferente dependendo da espécie de *Plasmodium spp.* Gametócitos de *P. falciparum*, por exemplo, levam de 8 a 10 dias para a maturação envolvendo as cinco fases morfológicas características (estágio I-IV) (SINDEN, 1978), já os gametócitos de *P.*

vivax levam somente 48 horas para a sua maturação, o que contribui para a presença dessas formas na circulação sanguínea dentro de uma semana na circulação sanguínea do hospedeiro, o que torna possível sua visualização sob microscópio óptico (MCKENZIE; COLLINS, 2007). No caso de parasitas murinos, como *P. berghei* e *P. yoelii*, a maturação do gametócito leva somente 24 ou 27 horas.

Estudos recentes apontam a medula óssea do hospedeiro humano e murino como um sítio primário de desenvolvimento e maturação de gametócitos (NIZ *et al.*, 2018). Uma vez que o desenvolvimento de gametócitos no hospedeiro é essencial para a manutenção do potencial patológico da doença e ciclo do parasita, tais estudos podem indicar uma dinâmica diferente quanto à migração de gametócitos para a corrente sanguínea e derme durante a infecção. Após um repasto sanguíneo em hospedeiro previamente infectado, essas formas gametocíticas maduras são internalizadas pelo mosquito e em seu intestino se diferenciam em gametas femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos), processo esse dependente da variação de temperatura e pH, por exemplo (BILLKER; MILLER; SINDEN, 2000). A fertilização ocorre de modo a originar um zigoto diploide, o qual se desenvolve em oocinetos flagelados responsáveis por penetrar o intestino do mosquito a fim de se desenvolverem em oocistos. As formas esporozoítas derivam de oocistos maduros e migram para glândula salivar do mosquito de modo a estarem disponíveis para a infecção em um novo repasto sanguíneo.

1.3 Sintomatologia e tratamento

A replicação das formas assexuadas do parasita na corrente sanguínea do hospedeiro infectado resulta nas manifestações clínicas da malária. Os primeiros sintomas da malária aparecem depois de 7 a 15 dias após a infecção e são pouco esclarecedores e muito se assemelham à sintomas de uma simples indisposição (GAZZINELLI; KALANTARI; FITZGERALD, 2014). Por esse motivo, um diagnóstico mais preciso e mais eficiente a fim de minimizar sequelas se torna especialmente mais difícil. A patologia se caracteriza por: dores de cabeça, cansaço, desconforto abdominal, dores musculares e, ocasionalmente, náuseas, vômitos e ocasionalmente, febre (COWMAN *et al.*, 2016; NICHOLAS J WHITE *et al.*, 2013; STORM; CRAIG, 2014).

Em áreas endêmicas, a malária é a principal doença relacionada a casos de febre (NICHOLAS J WHITE *et al.*, 2013). Os acessos febris da malária estão relacionados com o ciclo eritrocítico de cada espécie de parasita em questão, ou seja, o rompimento dos esquizontes que libera parasitas na corrente sanguínea, o que ativa monócitos e macrófagos, induzindo uma resposta à inflamação, causando a febre (MILNER, 2018). A infecção por *P. vivax* e *P. ovale* provoca acessos febris com uma frequência de 48 horas, sendo assim denominada febre terçã benigna. A infecção por *P. falciparum* provoca acessos com o mesmo intervalo de tempo e é tratada como febre terçã maligna. *P. malariae* provoca a febre quartã com acessos febris a cada 72 horas e, o mais recentemente descoberto, *P. knowlesi*, provoca febre a cada 24 horas (ANTINORI *et al.*, 2012; WHITE, 2008). Outros sintomas podem ser indicadores no diagnóstico de uma complicação na infecção, tais como insuficiência renal, disfunção hepática, edema pulmonar, hemoglobinúria, distúrbios hemorrágicos, de coagulação, malária cerebral (MC) e anemia (DUNST *et al.*, 2017; STORM; CRAIG, 2014).

A malária requer intensos cuidados médicos, um tratamento adequado e, principalmente, eficiente. No ano de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS), no guia de tratamento para malária, recomenda a confirmação de casos da doença a partir de análises parasitológicas em indivíduos sintomáticos. A realização de teste de diagnóstico rápido (RDTs), por exemplo, foi introduzida na região da África Subsaariana durante a última década e possibilitou, apesar dos recursos escassos, a confirmação de casos da doença aonde outros métodos não estavam disponíveis (WHO, 2015). Esse teste imunocromatográfico possibilita o diagnóstico através da utilização de anticorpos monoclonais para detecção de proteínas do parasita nos pacientes com suspeita da doença. Os principais anticorpos utilizados em RDT são *PfHPR2* (*histidine-rich protein 2*), expresso somente em *P. falciparum*; LDH e aldolase (BASU, 2017; MURPHY *et al.*, 2013; WHO, 2015). No Brasil, o diagnóstico mais utilizado é o teste de gota espessa (WHO, 2015).

Com o tratamento correto com fármacos apropriados no começo do estágio sintomático da doença, a remissão dos sintomas pode ser observada, mesmo no caso de uma infecção a partir de *P. falciparum*. No entanto, a recorrência de qualquer sintoma refletiria em um tratamento incompleto, resistência ao fármaco utilizado ou ainda, uma nova infecção. Tradicionalmente, o uso de cloroquina e mefloquina (derivados da quinina, um antimalárico natural extraído das cascas da quina) é bastante difundido (ALONSO *et*

al., 2011). No caso de infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, por exemplo, onde subseqüentes infecções podem surgir em intervalos regulares devido às formas dormentes hipnozoítas residentes no fígado de hospedeiros, o tratamento prolongado com 8-aminoquinolona é responsável pelo *clearance* do parasita (COWMAN *et al.*, 2016).

Atualmente, o artesunato (derivado de artemisinina, substância isolada da planta *Artemisia annua* L.) é um dos mais importantes tratamentos. Estudos comprovam que, em comparação com a quinina, o artesunato diminui significativamente a mortalidade da malária desencadeada por *P. falciparum* (DONDORP *et al.*, 2010). Tratamentos a partir de artemisinina são recomendados por todo o mundo, pois se mostram bastante eficazes e seu custo tem sofrido gradual redução. Contudo, antimaláricos de má qualidade têm sido difundidos pela Ásia e África, o que compromete a efetividade do tratamento e seleciona por resistência os parasitas (NICHOLAS J WHITE *et al.*, 2013).

2. Malária Cerebral (MC)

A forma mais severa de malária causada pelo *P. falciparum* é a malária cerebral (MC). Devido a sua exclusiva habilidade de promover ligações com as células endoteliais do hospedeiro, *P. falciparum* desencadeia a síndrome de MC tanto em crianças como em adultos (MILNER, 2018).

A manifestação clínica da MC tem início com sintomas iguais ao de um caso de malária típico, contudo, em questão de minutos ou horas, o indivíduo infectado evolui para um estado de coma vegetativo seguido de morte (MILNER, 2018). Estudos mostram que sintomas como anemia e hemoglobinúria, que é a presença de hemoglobina na urina em quantidade anormalmente altas, por exemplo, são desencadeados em casos de malária severa (DUNST *et al.*, 2017; STORM; CRAIG, 2014). Elevada carga parasitária (>5%), hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos, hiper piroxia, icterícia e distúrbio da consciência, também são indicadores de pior prognóstico, bem como insuficiência renal, disfunção hepática, edema pulmonar, distúrbios hemorrágicos e de coagulação (SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004). A OMS propõe como critérios para diagnóstico de MC os seguintes parâmetros: estado de coma após repetidas convulsões ou pós correção de hipoglicemia (um sintoma também de malária grave), detecção de parasitas em formas

assexuais em teste de gota espessa e descarte de outro tipo de encefalopatia (WHO, 2000).

Embora não se tenha muitos esclarecimentos acerca de sua patogênese, os mecanismos patológicos e moleculares que implicam no desenvolvimento do quadro de malária grave compreendem a desregulação da resposta inflamatória à infecção do parasita associado ao extensivo dano endotelial e vascular (OLUWAYEMI *et al.*, 2013; STORM; CRAIG, 2014). Além disso, observa-se o estresse oxidativo, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células gliais, levando ao desenvolvimento de danos celulares irreversíveis, como a morte neuronal (BANGIRANA *et al.*, 2011; IDRO *et al.*, 2010).

Esse tipo de doença infecciosa desencadeia reações no cérebro, como o aumento de radicais livres, por exemplo, que, com o tempo, causam lesões cerebrais e danos celulares irreversíveis. Sabe-se que a MC causada por *P. falciparum* é comumente associada a um alto grau de mortalidade, especialmente em crianças na região da África. Em regiões endêmicas, a taxa de mortalidade de crianças de até 5 anos de idade acometidas por MC varia de 10% a 20% (MILNER, 2018). Porém, entre os sobreviventes, danos cognitivos são comuns, graves e persistentes. Dentre eles destacam-se a perda de memória, convulsões, deficiência visual, comprometimento da fala, monoparesia e hiperatividade (BARONE *et al.*, 2012; CASTILLA GUERRA *et al.*, 2008). Assim, uma possibilidade, no que diz respeito à reversão e/ou prevenção do dano cognitivo e do estresse oxidativo causado nas células cerebrais, é o uso de antioxidantes aliados aos antimaláricos tradicionais.

2.1 Fisiopatologia da MC

Sabe-se que a MC caracteriza um complexo cenário multifatorial (GAZZINELLI; KALANTARI; FITZGERALD, 2014). Os mecanismos moleculares que sustentam e geram essa síndrome que compromete a cognição ainda não são propriamente investigados e exigem maior elucidação no que diz respeito ao estabelecimento de um quadro de neuroinflamação e conseqüente dano cerebral. Porém, cada vez mais estudos têm demonstrado que a severidade de infecções ocasionadas por *P. falciparum* tem se

caracterizado a partir da citoaderência de hemácias parasitadas no endotélio vascular que leva a uma superexpressão de mediadores, como moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (HANSON *et al.*, 2015; SILAMUT *et al.*, 1999), por exemplo, bem como pela resposta imune montada pelo hospedeiro frente à infecção (TAOUFIQ *et al.*, 2011).

O sequestro de hemácias é mediado por modificações geradas em sua membrana a partir da infecção, o que torna essa célula mais enrijecida e com um caráter mais adesivo, o que favorece o acúmulo não só nos capilares sanguíneos, como também à aglutinação com hemácias não infectadas, contribuindo para o fenômeno de formação de “rosetas” (COWMAN *et al.*, 2016; STORM; CRAIG, 2014). A interação das hemácias com as paredes dos capilares sanguíneos nos quais estão acumuladas contribui para a ativação do endotélio e, conseqüente aumento de expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e endoteliais (VCAM-1) (**Figura 5**). Além disso, observa-se o aumento dos níveis de angiopoietina-2 (Ang-2) (HANSON *et al.*, 2015), mediador da ativação endotelial; e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (YEO *et al.*, 2014), importante fator regulador do tônus vascular; marcadores da severidade da doença.

Esta interação da hemácia parasitada com o endotélio do hospedeiro se dá, principalmente por meio da ligação da proteína PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte protein 1*) expressa na superfície de hemácias parasitadas com *P. falciparum* com proteínas presentes no endotélio do hospedeiro. A PfEMP1 é ancorada à membrana de hemácias parasitadas através de sua ligação a proteínas do citoesqueleto e subsequente ligação submembranar a uma estrutura conhecida por KHARP (*knob associated histidine rich protein*), formando “knobs”, uma espécie de protuberância na membrana. Esses “knobs” podem ser visualizados co-localizados a ligantes vasculares (Dondorp *et al.*, 2004) (**Figura 5**).

Recentemente, identificou-se a proteína EPCR (endotelial protein C receptor) como um sítio de ligação para PfEMP1 (BUFFET *et al.*, 2013). Essa proteína é expressa comumente na vasculatura cerebral e desempenha um papel essencial no que diz respeito à estabilização endotelial a partir da ativação da proteína C. A partir da ligação das hemácias parasitadas à EPCR por meio do domínio CIDR (Região de interdomínio rica em cisteína) de PfEMP1, a ativação da proteína C é bloqueada, o que culminaria em

uma coagulopatia localizada e disfunção endotelial (BUFFET *et al.*, 2013; MILNER, 2018).

Estudos clínicos têm mostrado um perfil pró-coagulante em pacientes com MC. A oclusão vascular causada pela adesão das hemácias parasitadas no endotélio culmina na desregulação da angiogênese. Evidências recentes mostram que VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), regulador chave da angiogênese, encontra-se super expresso no tecido cerebral de pacientes diagnosticados com MC (HEMPEL *et al.*, 2014). Apesar do seu papel controverso, acredita-se que a situação de hipóxia favoreça o aumento da expressão de VEGF através do fator de transcrição HIF-1 (fator 1-alfa induzível por hipóxia) (CANAVESE; SPACCAPELO, 2014; HEMPEL *et al.*, 2014). Paradoxalmente, pacientes infectados com *P. falciparum* exibem sangramento, com tempos de protrombina e protrombina parcial prolongado, e deficiência na agregação, confirmando a coagulopatia associada a malária, com deficiência nos fatores de cascata de coagulação V, VII e IX. Ainda, a expressão do fator tissular por macrófagos consome proteínas da cascata de coagulação, o que pode contribuir com a hemorragia associada a MC (HEYDE *et al.*, 2006).

A infecção por *P. falciparum* é extremamente relacionada com um estabelecimento de uma resposta imune de caráter inflamatório montada pelo hospedeiro (HUNT *et al.*, 2014; OTTERDAL *et al.*, 2018). Ainda que esse tipo de resposta seja de suma importância para o *clearance* do parasita e estabelecimento de um ambiente de recuperação, a exacerbação do estímulo dessa resposta pode levar a progressão da doença e gerar danos teciduais (OTTERDAL *et al.*, 2018).

A resposta imune inflamatória que é montada frente a uma infecção por *P. falciparum*, envolve diversas células imunes e suas mais diversas interações (OTTERDAL *et al.*, 2018). O quadro de MC é caracterizado principalmente pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias próprias do fenótipo celular Th1, dentre elas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 (DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017; HUNT; GRAU, 2006). Tais citocinas são críticas para o controle da infecção por *P. falciparum* no que diz respeito ao seu ciclo exoeritrocítico e eritrocítico (HUNT *et al.*, 2014; HUNT; GRAU, 2006). Os monócitos e macrófagos polarizados no perfil M1, majoritariamente, são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção. Algumas irão atuar a favor do hospedeiro, ajudando no controle da infecção, como IL-12; e outras poderão

atuar a favor do progresso da patologia, como o TNF- α (SCHOFIELD; NOVAKOVIC; SCHWARZ, 1996). Neutrófilos, os leucócitos mais abundantes da circulação sanguínea, são as células que atuam primeiramente contra a infecção. Estudos apontam para a formação de armadilhas extracelulares (NETs), que atuariam no *clearance* do parasita, e ainda a secreção de proteases, tais como a mieloperoxidase (MPO), que pode contribuir para o dano tecidual (FEINTUCH *et al.*, 2016; OTTERDAL *et al.*, 2018).

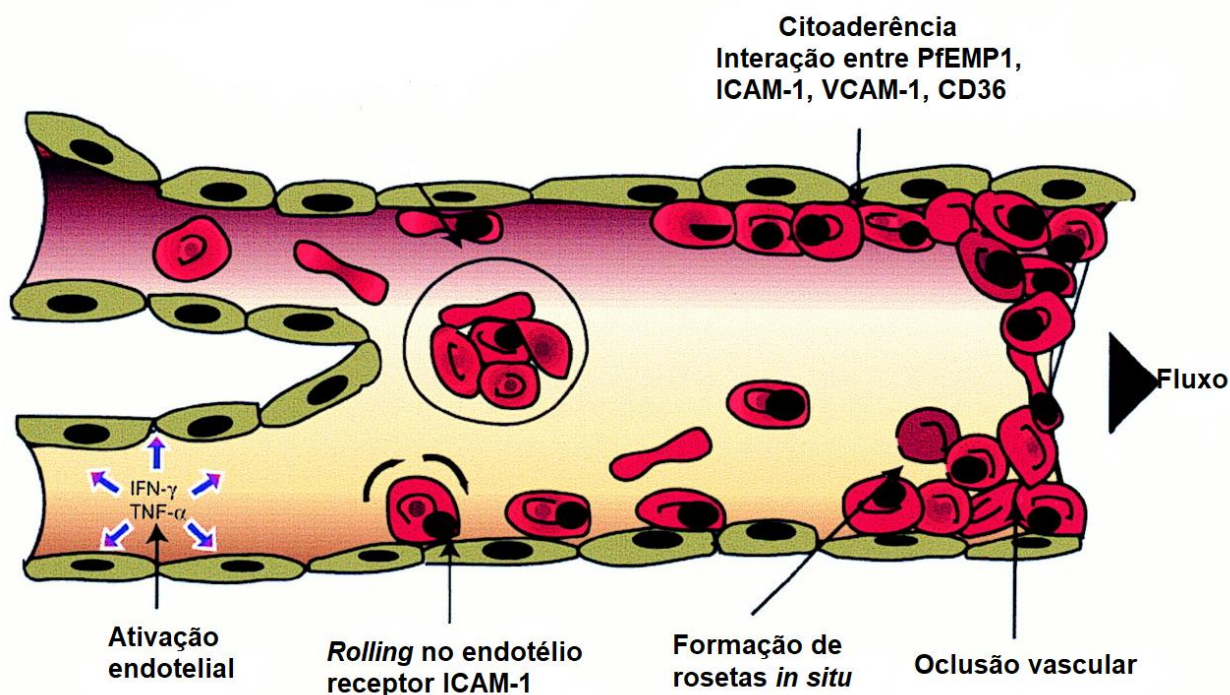


Figura 5: Citoaderência na vasculatura capilar. Hemácias parasitadas se ligam ao endotélio vascular, bem como à outras hemácias parasitadas ou não, contribuindo para a oclusão vascular. Os antígenos do parasita estimulam citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α), que culminam na regulação de moléculas de adesão no endotélio. ICAM-1 pode mediar o *rolling* no endotélio, enquanto CD36 e outros, por exemplo, a aderência. Adaptado de Chen *et al.*, 2000.

Produzido por macrófagos (via iNOS), células endoteliais (eNOS) e células neuronais (nNOS), o óxido nítrico (NO) tem um papel controverso na patogênese da MC. Em condições fisiológicas normais, o NO está relacionado com a regulação do tônus vascular, contudo, em condições patológicas, espécies reativas de nitrogênio (RNS) que derivam do NO podem contribuir para o aumento da injúria tecidual (GAUT *et al.*, 2002;

ISCHIROPOULOS, 1998). A partir da reação de oxidação de L-arginina para L-citrulina, o radical livre óxido nítrico (NO) é sintetizado e pode se combinar com ânions superóxido para então gerar peroxinitrito (ONOO⁻), o qual agrava ainda mais a injúria neuronal e tecidual da patologia (BLOODSWORTH; DONNELL; FREEMAN, 2000; GAUT *et al.*, 2002). Alguns estudos envolvendo modelo experimental murino, relacionam o NO com o aumento da expressão da angiopoietina 1 (Ang1), que modula a atividade de Ang-2, participando da ativação endotelial, permeabilização vascular e aumento da produção de TNF- α e expressão de ICAM-1 e VCAM-1, que favorecem a fisiopatologia da MC (FIEDLER *et al.*, 2006; RUDIN *et al.*, 1997). Contudo, outros estudos que também envolvem modelo experimental murino, relacionam a baixa disponibilidade de NO com o pior prognóstico durante a MC e a suplementação com doadores de NO parece ter um papel protetor contra a doença, levando a uma diminuição nos níveis das citocinas INF γ , TNF- α , MCP-1, da molécula de adesão ICAM-1 (DE MOURA CARVALHO *et al.*, 2014; GRAMAGLIA *et al.*, 2006; SERGHIDES *et al.*, 2011).

No interior do hospedeiro, durante o início da infecção pelo *Plasmodium spp.*, o ciclo eritrocítico do parasita estimula fortemente os macrófagos (MILNER, 2018). A partir do rompimento de esquizontes que liberam formas merozoítas do parasita na corrente sanguínea, padrões moleculares (PAMPs) associados ao patógeno podem ser reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, a partir dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os receptores do tipo TOLL (*toll like receptors* - TLRs) (NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013) detectam os PAMPs na superfície dos endossomos ou do próprio parasita, enquanto os receptores do tipo NOD (*NOD like receptors* - NLRs) (BARBALAT *et al.*, 2011) e RIG-1 (*RIG-1 like receptors* - RLRs) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010), detectam os PAMPs no citosol da célula do hospedeiro, levando a uma resposta inflamatória, que tem por finalidade o *clearance* do parasita. Contudo, uma ativação excessiva desses PRRs pode contribuir para um quadro de inflamação sistêmica que culminaria na falência de múltiplos órgãos, comprometendo o hospedeiro (GAZZINELLI; KALANTARI; FITZGERALD, 2014).

Um dos principais PAMPs do parasita é a âncora de glicosilfosfatidilinositol (*GPI anchor*). Geralmente, ela é formada por duas cadeias de ácido graxo unidos a um glicerol que, por sua vez, está unido a um grupo fosfoinositol; manose e uma glucosamina que se ligará à porção C-terminal de um aminoácido de uma proteína. É responsável por

ancorar a maioria das proteínas de superfície do parasita à sua membrana plasmática, sendo essencial para sua sobrevivência (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001). Esse glicolípido é reconhecido através dos PRRs e ativa, principalmente os heterodímeros TLR2-TLR6 e TLR1-TLR2, ou ainda, TLR4 (KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; PRASANNAVENKATESH DURAI, 2013), induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, o que inclui a IL-1, IL-6, M-CSF (fator estimulador de crescimento de colônia de macrófagos), TNF- α , linfotóxina, espécies reativas de oxigênio como o superóxido (via síntese pela NADPH oxidase ou por disfunção mitocondrial) e óxido nítrico (NO) (HANSON *et al.*, 2015; MILNER, 2018; STORM; CRAIG, 2014). Além disso, estudos feitos a partir de células endoteliais vasculares de cordão umbilical humano apontam para a indução da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina através da ativação dos receptores dessas células com âncoras GPI, indicando que esse PAMP ainda contribuiria para o fenômeno de citoaderência e disfunção endotelial relacionada à infecção (SCHOFIELD; NOVAKOVIC; SCHWARZ, 1996).

Durante o ciclo eritrocítico, o parasita digere a hemoglobina da hemácia no qual está inserido como uma fonte de aminoácidos. A oxidação da hemoglobina é um processo essencial para a sua nutrição, porém gera metabólitos protoporfirínicos que são potencialmente tóxicos tanto para o parasita como para o hospedeiro, como o grupamento heme (JANI *et al.*, 2008). Como uma estratégia de sobrevivência, o parasita adaptou-se a detoxificar esse grupamento cristalizando-o em hemozoína, inerte para o seu ciclo de vida (JANI *et al.*, 2008). A hemólise está diretamente relacionada com a fisiopatologia da malária. A quantidade de hemozoína presente no interior de fagócitos que internalizaram hemácias parasitadas reflete a carga de parasitemia do hospedeiro e é, portanto, um marcador da severidade da doença (DEROOST *et al.*, 2015; JANI *et al.*, 2008). Estudos apontam que, tanto em humanos como em camundongos, a hemozoína é capaz de ativar monócitos e macrófagos de modo que essas células secretem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como MCP-1 TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (COBAN *et al.*, 2005; JARAMILLO *et al.*, 2009; PARROCHE *et al.*, 2007; SHIO *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos demonstram que hemozoína produzida em culturas de *P. falciparum* poderiam se ligar à proteínas, lipídios e ácidos nucleicos do parasita e também do hospedeiro (PARROCHE *et al.*, 2007). Assim sendo, a hemozoína que se encontra ligada ao material genético do parasita direciona-se até o fagolisossomo e citosol do hospedeiro,

onde ativaria receptores TLR9, inflamossomos e outros receptores citosólicos (GAZZINELLI; KALANTARI; FITZGERALD, 2014; PARROCHE *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que a hemozoína sintética, em células dendríticas e macrófagos murinos é capaz de ativar receptores TLR9, assim como em linfócitos B humanos (COBAN *et al.*, 2005).

Em modelos experimentais murinos, o grupamento heme é responsável por ativar os receptores TLR4 (FIGUEIREDO *et al.*, 2007) e em excesso, quando livre, promove uma resposta inflamatória que culmina na formação de ROS, a qual resulta em estresse oxidativo e consequente dano microvascular e morte celular (WAGENER *et al.*, 2003). No organismo do hospedeiro, os efeitos tóxicos de heme livre são atenuados a partir da ação da enzima heme-oxigenase-1. Ela é responsável por converter o heme em monóxido de carbono (CO); biliverdina, posteriormente convertida em bilirrubina; e ferro livre, favorecendo a proteção ao desenvolvimento da MC em camundongos (FERREIRA *et al.*, 2007; PAMPLONA *et al.*, 2007). Contudo, em humanos infectados com *P. falciparum*, a carboxihemoglobina, um subproduto da reação de catalização do heme por meio da heme-oxigenase-1, demonstrou potencial para exacerbar a disfunção de vários órgãos durante a fase aguda da doença (YEO *et al.*, 2013).

Além do estabelecimento do quadro de inflamação e citoaderência de hemácias parasitadas, a MC é associada com o aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (HEYDE *et al.*, 2006). A adesão da hemácia parasitada ao endotélio cerebral pode gerar, por si só, uma menor oxigenação tecidual, o que ocasionaria um quadro de hipóxia e ao consequente desenvolvimento de acidose metabólica (COWMAN *et al.*, 2016). Em um estudo realizado por Taylor e colaboradores (2004), verificou-se a presença de *P. falciparum*, a partir de cortes histológicos, em mais de 20% dos capilares sanguíneos do cérebro de crianças que morreram acometidas por malária (TAYLOR, TERRIE E *et al.*, 2004). Essa obstrução microvascular é um possível resultado do sequestro desses eritrócitos pelo cérebro. Em crianças africanas, a partir de autópsias, foi notado que, por mais que a BHE, barreira celular que reveste o cérebro, estivesse intacta após a morte, há um possível aumento em sua permeabilidade a partir do rompimento de junções intercelulares endoteliais (DOROVINI-ZIS *et al.*, 2011).

O comprometimento da integridade da BHE e a neurodegeneração afeta diretamente a dinâmica celular cerebral, como por exemplo, a distribuição e propriedades

de astrócitos e microglia, células componentes do parênquima cerebral (HUNT; GRAU, 2006). A microglia se caracteriza como as células imunes inatas do sistema nervoso central (SNC) e a maior população de células residentes desse sistema (ISABELLE M. MEDANA, 1997). Constantemente provém condições ótimas do microambiente e produz fatores que influenciam as células dispostas ao redor, comumente os astrócitos e os neurônios. Os astrócitos, por sua vez, consistem em uma população de células gliais do SNC que majoritariamente oferecem suporte ao tecido nervoso (SOFRONIEW; VINTERS, 2010), são responsáveis por responder aos insultos teciduais (GLASS *et al.*, 2010).

Sob condições fisiológicas, as células da microglia exibem um fenótipo “em repouso”, ou seja, desativado, que é associado com a produção de moléculas anti-inflamatórias e fatores neurotróficos. Porém, em resposta à invasão de algum patógeno, a microglia modifica o seu fenótipo para um estado ativado, capaz de fornecer uma resposta imune de modo a proteger o tecido. Estudos demonstram que indivíduos acometidos com MC apresentam intensa astrogliose, degeneração de astrócitos e ativação da microglia (HUNT, 2001). Ativação de células da glia e ativação de enzimas, apesar de serem fenômenos autolimitantes, são frequentemente associadas com a neurotoxicidade a partir do estresse oxidativo (GLASS *et al.*, 2010).

2.2 Função cognitiva

Dentre os mecanismos patológicos e moleculares que implicam no desenvolvimento das sequelas cognitivas desencadeadas pela MC está o estresse oxidativo (BARONE *et al.*, 2012; OLUWAYEMI *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2012). De forma geral, doenças que comumente apresentam um quadro de neuroinflamação tendem a exibir uma quantidade aumentada de ROS e RNS no tecido cerebral, o que culmina na peroxidação lipídica, nitrosilação de proteínas, dano no DNA e quebra da BHE, resultando na morte neuronal e no dano cognitivo (MANEEN; CIPOLLA, 2007; TANG *et al.*, 2008).

As injúrias causadas no cérebro por tais reações inflamatórias resultam em sequelas que, em grande parte dos casos, acarretam em óbito. Esse declínio cognitivo não está somente presente em casos de pacientes com doenças neurodegenerativas e que já estão acometidos pelo processo natural de envelhecimento, mas, se mostra evidente também em pacientes que foram diagnosticados com MC. Diversos estudos clínicos envolvendo crianças acometidas e/ou recuperadas de MC demonstram que apesar da administração de antimaláricos durante o curso da doença as sequelas cognitivas não são evitadas nem tão pouco amenizadas (BANGIRANA *et al.*, 2011; CARTER *et al.*, 2005). Essas injúrias cerebrais muitas vezes se desenvolvem em longo prazo e possuem caráter permanente (HIGGINS; KAIN; LILES, 2011).

Em um estudo realizado por Idro e colaboradores (2010), crianças da região de Uganda que foram acometidas em algum momento da vida por MC foram avaliadas quanto ao estabelecimento de sequelas severas cognitivas e disfunção neurológica residual da infecção. Os dados referentes a essas crianças foram analisados por um especialista na área de neurologia pediátrica com relação à descrição de déficits na função motora, na fala, na visão, na audição, bem como problemas comportamentais e epilepsia. De forma relevante, dentre as crianças atendidas, cerca de 40% apresentaram disfunção cognitiva severa e outras sequelas como cegueira (aparentemente reversível), dificuldades na fala, na audição e epilepsia (IDRO *et al.*, 2010).

Os neurônios são células cerebrais altamente especializadas e muito dependentes de oxigênio. Por isso, são muito frágeis em relação ao dano mitocondrial causado por radicais livres (HUNT; GRAU, 2006). Essas células cerebrais demonstram uma enorme interação metabólica com astrócitos em termos de recaptção de neurotransmissores, distribuição do substrato energético e defesa contra o estresse oxidativo (ISABELLE M. MEDANA, 1997; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Assim, tendo em vista os danos sofridos pelos neurônios, a vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo é manifestada pelo acúmulo de lipídios oxidados, proteínas e DNA, os quais parecem estar envolvidos na deterioração das habilidades motoras e cognitivas (BIESALSKI, 2002). A MC exerce influência no funcionamento de neurotransmissores, causando danos nos mesmos e, posteriormente, na habilidade de cognição do cérebro. Esses neurotransmissores, tais como o glutamato, por exemplo, são essenciais para a indução

de ligações sinápticas e provaram estar completamente envolvidos no processo de aprendizagem e memorização (VIANNA, M R *et al.*, 2000).

Basicamente, o processo de formação da memória, a memorização, pode ser dividido em aquisição, consolidação e evocação. Todas as memórias são associativas, ou seja, são adquiridas através da ligação com um grupo de estímulos. Esses estímulos podem ser desde sensações físicas, táteis, olfativas, visuais ou auditivas. Segundo Izquierdo (2013), as memórias que persistem além de segundos denominam-se memórias de curta e de longa duração, as quais requerem, para sua formação, uma série de passos moleculares na região do hipocampo, núcleos amigdalinos e em outras áreas. A memória de curta duração mantém a cognição funcionando durante o tempo que a memória de longa duração leva para ser consolidada (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013).

O hipocampo parece estar envolvido no condicionamento contextual e na formação e consolidação da memória referente a modulação de mecanismos de defesa a estímulos (PENTKOWSKI *et al.*, 2006). Além disso, estudos demonstram que o hipocampo participa da formação da representação do contexto, da composição sensorial, temporal e espacial (MATUS-AMAT *et al.*, 2004; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003).

A cascata de sinalização se inicia com a ativação dos receptores do glutamato, que podem ser do tipo metabotrópicos ou ionotrópicos, um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central. Estes receptores compreendem os receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato), o AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-5-4- isoxazolpropiónico) e cainato. Participam ainda os receptores GABAérgicos, colinérgicos do tipo muscarínicos, β -adrenérgicos e também os receptores serotoninérgicos (IZQUIERDO, IVAN; MEDINA, 1997).

Os receptores NMDA podem ser ativados através do glutamato pré-sináptico ou, ainda, por meio da despolarização pós-sináptica. Quando a membrana pré-sináptica é ativada, inúmeros neurotransmissores são liberados na fenda sináptica, dentre eles, o glutamato. Devido ao potencial negativo de repouso, os receptores NMDA têm seus canais iônicos bloqueados por meio de íons Mg^+ , contribuindo para que poucos íons possam atravessá-lo. Porém, o fluxo de íons Na^+ e K^+ através dos canais iônicos dos receptores AMPA geram a despolarização da membrana pós-sináptica e a abertura dos

canais iônicos dos receptores NMDA por meio do deslocamento dos íons Mg^{+} (GRIENBERGER; KONNERTH, 2012).

Posteriormente, ocorre uma mobilização de cálcio para o meio intracelular, que leva a ativação da proteína cálcio calmodulina kinase II (CaMKII), que é responsável pela fosforilação de diversas proteínas (IZQUIERDO, IVAN; MEDINA, 1997). Ela é localizada na fenda pós-sináptica, área da membrana plasmática de neurônios em que há alta elétron densidade, juntamente com a proteína PSD-95 (*postsynaptic density 95*) e outras. Essas duas proteínas exibem muita afinidade com a subunidade NR2B dos receptores NMDA (GARDONI *et al.*, 2001; OMKUMAR, 2009). PSD-95 é essencial para a maturação dos neurônios e estabilização de sinapses. Estudos correlacionam a alta expressão dessa proteína em neurônios hipocampais com a maturação das sinapses glutamatérgicas, bem como dos terminais pré-sinápticos, favorecendo a plasticidade neuronal e todo o processo de formação e consolidação da memória (EL-HUSSEINI *et al.*, 2000; TAFT; TURRIGIANO; TURRIGIANO, 2014). Além disso, PSD-95 é responsável por mediar a ligação dos receptores NMDA com moléculas *downstream* de cascatas de sinalização pós-sinápticas, como Src, SynGAP e nNOS (LIM, INDRA A *et al.*, 2003).

Além dos canais iônicos dos receptores NMDA, os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) e reservas citosólicas de cálcio, como o retículo endoplasmático, são outras fontes que contribuem para a o nível de cálcio intracelular (NEVIAN; SAKMANN, 2006). O aumento de íons cálcio em neurônios pós-sinápticos culmina, ainda, na ativação do fator de transcrição CREB que atua na ativação da transcrição de proteínas responsáveis pela formação e consolidação de memória, como o BDNF (*brain derived neurothrophic factor*); da proteína quinase A (PKA); da proteína quinase C (PKC), que também é ativada pela ligação da acetilcolina a seu receptor muscarínico; e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (IZQUIERDO, IVAN; MEDINA, 1997; WANG, HUI; PENG, 2016)

Tais proteínas são essenciais para o processo de geração da potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo (WANG, HUI; PENG, 2016; YANG *et al.*, 2010). A LTP é o aumento de tamanho da resposta de um grupo de neurônios por meio da estimulação repetitiva durante alguns segundos que ocorre no hipocampo durante a consolidação de memórias (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013). Em contrapartida, dependendo das sinapses estabelecidas e da estimulação, pode ocorrer a depressão de

longa duração (LTD) (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013; VIANNA, M R *et al.*, 2000).

Uma das principais proteínas descritas como essencial para o processo de formação e consolidação da memória de longo prazo, bem como para a plasticidade e função sináptica, é o BDNF (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013). Membro da família das neurotrofinas, é sintetizado como uma pró-proteína, que é clivada em proteína madura pela plasmina (PANG, 2004). O pró-BDNF é capaz de se ligar ao receptor p75NTR, levando a célula a entrar em apoptose, e o BDNF maduro se liga ao receptor TrkB (receptor de tirosina quinase B). Uma vez ligado ao receptor TrkB, ocorre a ativação da proteína treonina quinase PI3K (fosfatidilinositol 3 kinase) e da pequena GTPase Ras, levando a ativação das vias da AKT e MAPK, respectivamente (SWEATT, 2001). A ativação do receptor TrkB também leva a fosforilação e aumento da atividade do receptor NMDA, potencializando o estímulo em resposta a liberação do glutamato durante o processo de formação de memória (YAMADA; NABESHIMA, 2003).

De acordo com Comim e colaboradores (2012), camundongos infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com drogas antimaláricas logo após o aparecimento dos sinais clínicos de malária cerebral apresentam perda de memória 15 dias após a cura da doença parasitária e possuem quantidade reduzida de BDNF no hipocampo. Ao mesmo tempo, estes animais apresentam a neurotransmissão colinérgica intacta, como inferido pela medida da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo (COMIM *et al.*, 2012). Este dado sugere um possível mecanismo para perda de memória implicando o controle da produção de BDNF e possivelmente o receptor de NMDA.

Dentre as drogas utilizadas atualmente contra a malária, os antimaláricos tradicionais, tais como cloroquina, mefloquina e artemisina, por exemplo, não são capazes de reverter e/ou atuar na progressão do dano cognitivo acarretado por ela. Diversos estudos clínicos envolvendo crianças acometidas e/ou recuperadas de MC demonstram que apesar da ministração de antimaláricos durante o curso da doença as sequelas cognitivas não são evitadas, tampouco amenizadas (BANGIRANA *et al.*, 2011; CARTER *et al.*, 2005). Nesse contexto e, tendo em vista que o agravante dos casos de malária são as injúrias cerebrais, o estudo e o desenvolvimento de agentes farmacológicos que atuem no âmbito cerebral é ideal para o controle da morbidade causada por essa doença infecciosa (HIGGINS; KAIN; LILES, 2011).

3. Estatinas

As estatinas foram originalmente identificadas como metabólitos secundários de fungos (ALBERTS, 1988). Derivada do fungo *Penicillium citrinum*, mevastatina foi uma das primeiras estatinas isoladas naturalmente. Na sua forma ativa, mevastatina tem estrutura similar ao precursor HMG Co-A. Sendo assim, em um estudo realizado em ratos, foi capaz de inibir a biossíntese de colesterol com K_i de 1,4 nM (TOBERT, 2003). Contudo, induziu um quadro de hepatotoxicidade celular e o seu desenvolvimento foi descontinuado. Posteriormente, a lovastatina, tida como um metabólito mais ativo, foi isolada a partir do fungo *Aspergillus terreus*. Comparativamente, lovastatina mostrou-se mais potente ao inibir o precursor HMG Co-A, com K_i de 0,6 nM e não induziu hepatotoxicidade celular nos estudos experimentais com ratos. Assim sendo, lovastatina tornou-se a primeira estatina aprovada como agente atuante na hipercolesterolemia para ser usado em tratamentos clínicos em humanos (ALBERTS, 1990; LOPEZT *et al.*, 1980). A partir disso, inúmeras outras estatinas, naturais ou quimicamente sintetizadas, tornaram-se comercialmente disponíveis, tais como pravastatina, sinvastatina, atorvastatina, cerivastatina e, mais recentemente, pitavastatina e rosuvastatina, alvo do presente estudo (LIAO; LAUFS, 2005; ZHOU, QIAN; LIAO, 2010).

As estatinas atuam a partir da inibição metabólica de HMG Co-A redutase, reduzindo a síntese de colesterol e, conseqüentemente, da isoprenilação de diversas proteínas (LIAO; LAUFS, 2005). Todas as estatinas possuem estruturas similares à porção *3-hydroxy-3-methylglutarate* de HMG Co-A, assim sendo, ocupam o sítio que essa molécula ocuparia na enzima HMGR (ISTVAN *et al.*, 2016) (**Figura 6**). As estatinas não interferem na ligação de HMGR com a enzima NADPH (ISTVAN; LOUIS, 2002). O restante da molécula das estatinas possui um caráter rígido, hidrofóbico e altamente variável. Dentre as estatinas, as sintéticas, tais como atorvastatina e rosuvastatina, são as que apresentam habilidade de fazer maiores quantidades de interações com HMGR (ISTVAN *et al.*, 2016).

No fígado, a enzima limitante para a biossíntese de colesterol é a HMG Co-A redutase (HMGR), que catalisa a reação de desacetilação de HMG Co-A em mevalonato (RODWELL *et al.*, 1976). Além disso, HMGR é requerido na síntese de isoprenóides. Montados a partir de intermediários da via de biossíntese de esteróis, tais como IPP (*isopentenyl pyrophosphate*) e DMAPP (*dimethylallyl pyrophosphate*), os isoprenóides

são precursores de proteínas preniladas, entre outros (**Figura 7**). Altamente conservada em eucariotos, procaríotos e arque bactérias, a enzima HMGR possui seqüências homólogas dentre esses grupos e pode ser dividida em duas classes. A HMGR de classe 1, por exemplo, utiliza a enzima NADPH como doadora de elétrons e é mais comum em humanos (ISTVAN, 2001).

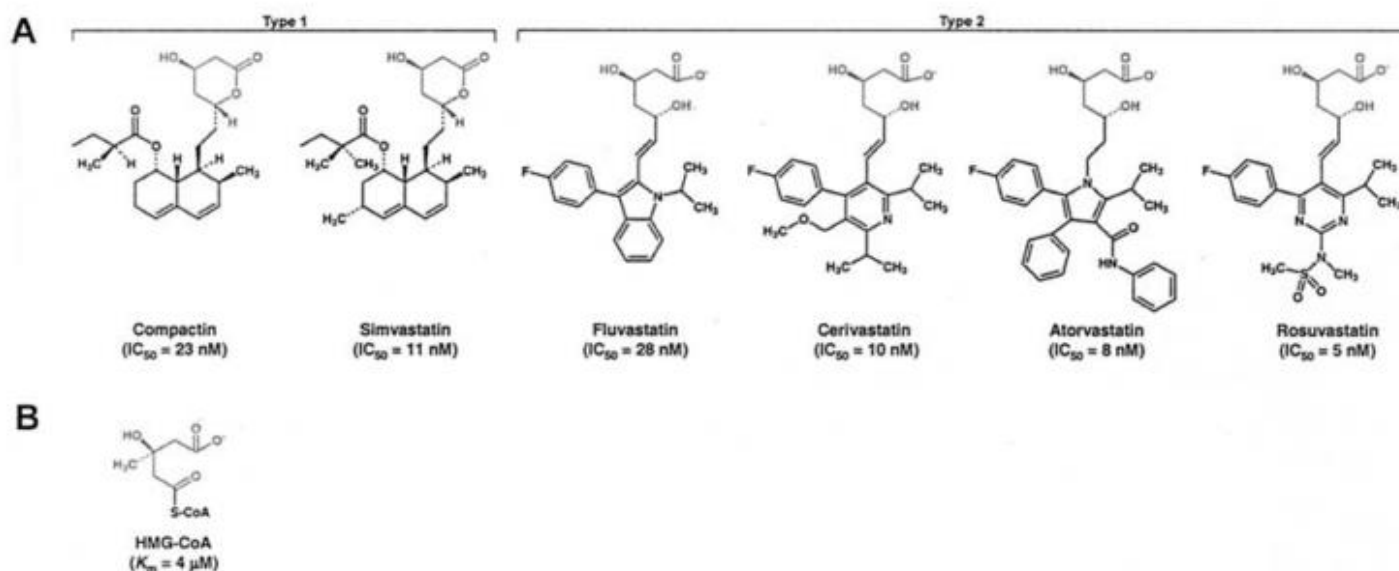


Figura 6: Estrutura química das diferentes estatinas e de HMG Co-A. **A)** As estatinas podem ser classificadas em inibidores não sintéticos ou naturais de HMG Co-A redutase (compactina/mevastatina e simvastatina) ou, ainda, em inibidores sintéticos (fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina e rosuvastatina). Elas ainda podem variar quanto ao caráter hidrofóbico (cerivastatina > rosuvastatina, que é parcialmente hidrofóbica). **B)** Estrutura de HMG Co-A como referência. ISTVAN; LOUIS, 2002.

As estatinas são ainda classificadas e ranqueadas quanto a sua potência no que se diz respeito à inibição de HMG Co-A redutase. Dentre as estatinas de segunda geração, o ranking de potência é de simvastatina > pravastatina > lovastatina = mevastatina. Os valores de IC₅₀ observado em humanos (*50% inhibitory concentration*), valor que corresponde à sua potência, de simvastatina e mevastatina são de 4 nM e 20 nM, respectivamente (BLUM, 1994; DANSETTE; JAOEN; PONS, 2000) (**Figura 6**). Por outro lado, as estatinas sintéticas de terceira geração quando comparadas com mevastatina, são muito mais potentes. As estatinas mais recentes partilham de algumas

propriedades físico-químicas, tais como uma maior meia-vida e caráter lipofílico (MCTAGGART *et al.*, 2001). Conseqüentemente, algumas estatinas, em especial atorvastatina, pitavastatina e rosuvastatina, demonstram ser mais efetivas no controle dos níveis de colesterolemia (LIAO; LAUFS, 2005). O caráter lipofílico confere a esses fármacos a habilidade de atravessar com maestria as células endoteliais a partir de difusão passiva, como é o caso de simvastatina, quando comparado com estatinas de caráter mais hidrofílico, como rosuvastatina, por exemplo.

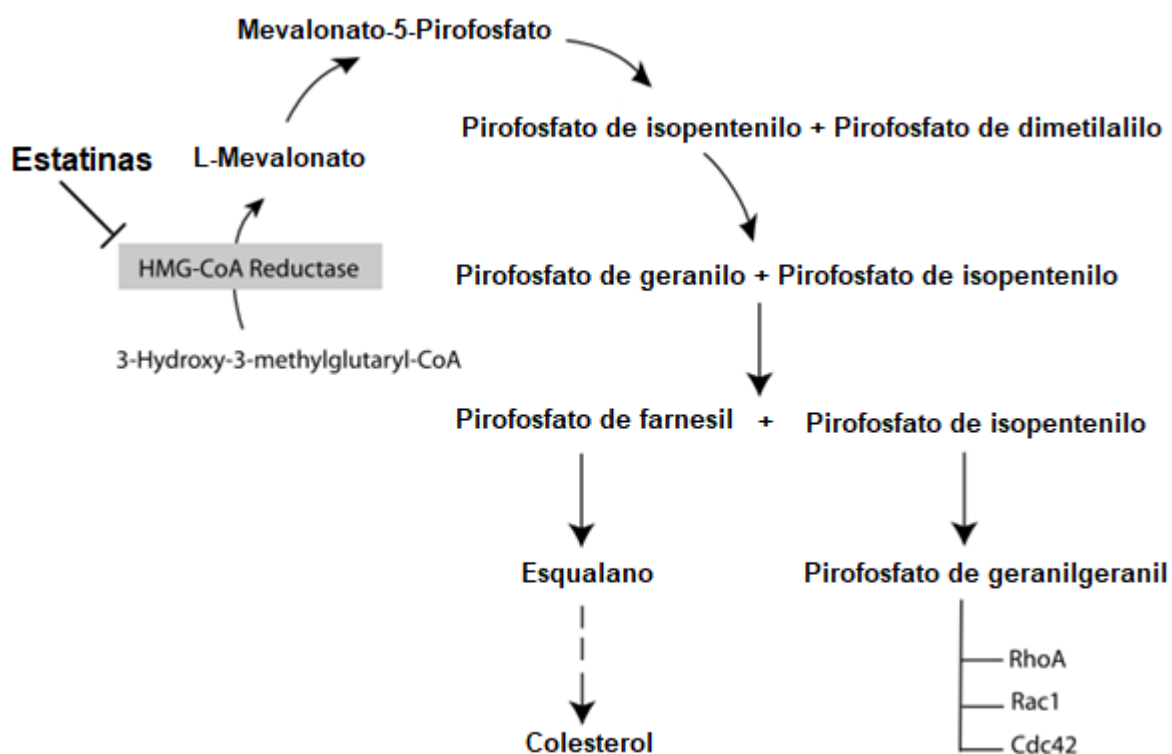


Figura 6: A ação biológica de isoprenóides. As estatinas inibem a atividade de *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A* (HMG Co-A) redutase e, conseqüentemente, a diminuição da isoprenilação das moléculas de sinalização intracelular, tais como RhoA, Rac1 e Cdc42. Adaptado de ZHOU, QIAN; LIAO, 2010.

Entretanto, o caráter lipofílico não implica diretamente em efeitos extra-hepáticos em modelos animais ou humanos. Outros mecanismos estão envolvidos na habilidade de estatinas de caráter mais hidrofílico de exercer efeitos extra-hepáticos, tais como o OATP-C, um transportador de ânions presente no fígado que permite que esses fármacos sejam internalizados nos hepatócitos (CORSINI *et al.*, 1999; LIAO; LAUFS, 2005). As estatinas que possuem um caráter mais lipofílico, comumente penetram a membrana celular, contudo, as estatinas que possuem um caráter mais hidrofílico, como é o caso da rosuvastatina, são transportadas por meio da BHE através de múltiplos transportadores ou, até mesmo, por meio da ligação a transportadores de cassetes de ligação ao ATP (*ABC efflux transporters*), um grupo de proteínas transmembrana que garante o efluxo de substâncias endógenas e/ou xenobióticos, que garantem o efluxo desse fármaco nas células da microglia (FEHER *et al.*, 2015; GIBSON *et al.*, 2012).

Rosuvastatina, formalmente conhecida como ZD4522, é a mais nova inibidora de HMG Co-A redutase e, comparativamente, exibe um caráter relativamente mais hidrofílico tal como a pravastatina, por exemplo. Além disso, exibe a capacidade inibitória da biossíntese de colesterol mais efetiva dentre as estatinas, bem como a capacidade de alteração do perfil HDL (*high-density lipoprotein*) (MCTAGGART *et al.*, 2001). Estudos demonstram que tanto em hepatócitos humanos quanto murinos, rosuvastatina mostrou-se um inibidor farmacológico mais potente. No caso de hepatócitos murinos, foi capaz de atuar cinco vezes mais efetivamente quando comparada com outras cinco estatinas, exibindo uma potência significativamente maior (FEHER *et al.*, 2015; MCTAGGART *et al.*, 2001). Em humanos, a partir do estudo envolvendo o domínio catalítico purificado da enzima, rosuvastatina mostrou-se mais potente do que outras estatinas submetidas à mesma condição, com valores de IC₅₀ de 5,4 nM e sua potência foi oito vezes maior do que a potência apresentada pela pravastatina (MCTAGGART *et al.*, 2001).

No que diz respeito à sua atividade de inibição enzimática ao competir pelo sítio de HMG-CoA, rosuvastatina é capaz de garantir uma inibição reversível, porém eficaz. Rosuvastatina exibiu alta afinidade para o sítio ativo de HMGR em um estudo envolvendo domínios da enzima humana, com K_i de 0,1 nM, que é a constante de dissociação do fármaco. A atividade de rosuvastatina também foi avaliada quanto à sua farmacocinética. Estudos, realizadas em humanos, demonstraram que doses orais de 5-80 mg/kg exibiram, de forma linear, concentração máxima no plasma. Além disso, a meia-vida

deste fármaco foi de, aproximadamente, 20h. Sendo assim, rosuvastatina demonstra ter potencial para exercer efeito substancial em lipoproteínas e nos danos que geram (MCTAGGART *et al.*, 2001).

3.1 O papel das estatinas na neuroinflamação

Estatinas são drogas de uso clínico para o tratamento de hipercolesterolemia (TAYLOR, F *et al.*, 2013). Os efeitos benéficos das estatinas em desordens neurológicas agudas e crônicas resultadas a partir de injúria pós-traumática cerebral e/ou isquemia são associados com suas ações pleitrópicas desempenhadas no cérebro (STÜVE *et al.*, 2003). As estatinas inibem metabolicamente a HMG Co-A redutase, reduzindo a síntese de colesterol. Além disso, reduzem a isoprenilação de pequenas GTPases como Rho, Ras e Rac, causando mudanças na organização do citoesqueleto, adesão de quimiocinas circulantes, mecanismo de endocitose, sinalização de receptores, progressão do ciclo celular e expressão gênica, por exemplo (LIAO; LAUFS, 2005).

As pequenas GTPases são proteínas que atuam como “interruptores” moleculares. Essas proteínas podem apresentar-se em um estado dito ativado ou não ativado, onde estão ligadas à molécula de guanosina trifosfato (GTP) ou à guanosina difosfato (GDP), respectivamente. A ligação das pequenas GTPases à esses nucleotídeos geram modificações conformacionais que as permitem interagir com diversas moléculas efetoras previamente ativadas ou não (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013; JOHNSON; CHEN, 2012).

Os fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEFs) facilitam a dissociação de GDP e permitem o acoplamento de proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) que tem como função estimular a hidrólise da GTP para que ocorra a ativação da proteína. Portanto, o processo de troca de status molecular das pequenas GTPases é essencialmente composta por uma GEF e uma GAP. Para algumas GTPases que carregam um grupo farnesil ou geranilgeranil na sua extremidade C terminal, a alternância dos nucleotídeos GDP/GTP é combinada com a alternância no citosol/membrana, a qual é mediada por inibidores de dissociação de nucleotídeos guanina (GDIs) que formam complexos

solúveis com pequenas GTPases a partir da blindagem de seus lipídeos (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013).

Cada membro da família GTPase exerce um tipo de função específica em termos de morfologia celular, motilidade, secreção e proliferação. A proteína Rho está associada à formação de complexos de adesão, bem como ao aumento da sensibilidade vascular ao cálcio, o que favorece a vasoconstrição (AELST; SOUZA-SCHOREY, 1997; HALL, 1994, 2012; UEHATA; ISHIZAKI; SATOH, 1997). Dependente da ativação através da geranilgeranilação, a inibição de Rho e, conseqüentemente da proteína *downstream* Rho-kinase (ROCK) faz parte do efeito observado na parede vascular a partir do tratamento com estatinas (LAUFS, ULRICH; ENDRES; *et al.*, 2000; TAKEMOTO; SUN; HIROKI, 2002). Em contrapartida, os principais efeitos mediados pela GTPase Rac consistem em vias de sinalização que são responsáveis pela modulação do citoesqueleto e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos desenvolvidos em animais e também em humanos demonstram que o tratamento com estatinas é capaz de inibir a ativação de Rac. Em um modelo experimental animal, simvastatina foi responsável por prevenir o aumento da pressão arterial induzida por hipertrofia a partir da inibição da ativação de NADPH e Rac1 (WASSMANN *et al.*, 2001). Um estudo recente envolvendo a cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano, também aponta para a inibição de Rac1 a partir do uso de estatinas (RASHID *et al.*, 2009). Uma vez que NO é sequestrado por ROS, a propriedade antioxidante das estatinas pode contribuir também para a melhora da função endotelial (LIAO; LAUFS, 2005).

Dado seus efeitos pleiotrópicos, as estatinas seriam capazes de modular a neuroinflamação e a ativação de células da glia, processos que acarretam no comprometimento neuronal (BARONE *et al.*, 2012; COMIM *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2010), além da melhora da perfusão sanguínea cerebral (REIS *et al.*, 2012). Estudos recentes têm relacionado as estatinas com a supressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF- α em casos de isquemia cerebral e danos à medula espinhal (BALDUINI *et al.*, 2003). Em um estudo realizado por Feher e colaboradores (2015) foi investigado, a partir de ensaios em cultura de células de microglia, de qual forma rosuvastatina modularia a ação de citocinas pró e anti-inflamatórias, considerando efeitos na morfologia, expressão de genes e parâmetros funcionais dessas células. Foi observado que rosuvastatina não alterou os perfis basais de citocinas e nem seus níveis

em cultura, porém, foi capaz de inibir fortemente os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α quando essas células eram desafiadas com LPS. Além disso, rosuvastatina foi capaz de exercer um papel anti-inflamatório ao aumentar os níveis de IL-10 na cultura celular (FEHER *et al.*, 2015).

Em injúrias secundárias, incluindo efeitos sobre proteínas beta amiloide, a ação das estatinas foram reportadas em modelos experimentais de doença de Alzheimer e injúria pós-traumática, os quais demonstraram os efeitos neuroprotetores de estatinas, uma vez que o tratamento *in vivo* e *in vitro* reduziu a formação de proteínas amiloides (HÖGLUND; WALLIN; BLENNOW, 2006). Evidências crescentes têm demonstrado que as estatinas exerceriam efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas e neurológicas, como Alzheimer e Parkinson (AHN; CHOI, 2015). A redução de proteínas amiloides mediada pelo tratamento com estatinas tem relação direta com a melhora da perfusão vascular cerebral (PARIS *et al.*, 2003) e redução do estresse oxidativo no tecido com consequente redução do quadro inflamatório (WANG, QING *et al.*, 2011).

Estudos demonstram a habilidade desempenhada pelas estatinas de aumentar a expressão de NOS e sua atividade, contribuindo assim, para a melhora do tônus cerebrovascular e para o fluxo sanguíneo, parâmetros essenciais para a manutenção da recuperação de casos de injúrias teciduais (KUREISHI *et al.*, 2010; LAUFS, U; LIAO, 1998). Em um estudo envolvendo camundongos, o tratamento com estatinas por até duas semanas foi capaz de aumentar em até 30% o fluxo sanguíneo cerebral nesses animais e também diminuir em até 50% as lesões de infarto após a oclusão cerebrovascular experimental. No grupo de camundongos eNOS-/- não foi visto nenhuma alteração, o que demonstra que a regulação da enzima NOS foi essencial para o efeito de neuroproteção nesses animais. De forma interessante, foi observado que o tratamento com estatinas não exerceu efeitos quanto aos níveis de colesterol no plasma dos camundongos, indicando que o efeito neuroprotetor verificado consiste com uma via independente da vida do colesterol (ENDERS *et al.*, 1998).

Além disso, as estatinas têm sido relacionadas com a modulação da ativação da resposta imune ao induzir efeitos anti-inflamatórios na parede de vasos sanguíneos em casos de formação de placas de ateroma (VAUGHAN *et al.*, 2000). A capacidade imunomodulatória de estatinas gera a diminuição da expressão de P-selectina e adesão de leucócitos em vasos sanguíneos, bem como de ICAM-1, E-selectina e VCAM-1

(RASMUSSEN *et al.*, 2001; REZAIE-MAJD *et al.*, 2003; SCALIA *et al.*, 2001). Estudos envolvendo um modelo experimental de isquemia cardíaca e posterior reperfusão, demonstram que a atenuação de P-selectina ocorre por meio da regulação de NO (SCALIA *et al.*, 2001). Tal efeito benéfico pode impactar a severidade de uma isquemia cerebral, por exemplo e de casos de MC.

Sabe-se que as plaquetas desempenham um papel crucial em síndromes coronarianas agudas, bem como em doenças neurodegenerativas. Elas são associadas com a formação de trombos e injúria vascular. Estudos clínicos têm mostrado um perfil pró-coagulante em pacientes com MC, os quais exibem deficiência na agregação, favorecendo a coagulopatia associada a malária. (HEYDE *et al.*, 2006). A diminuição de trombos pelas estatinas pode ser associada com um mecanismo independente da via da biossíntese de colesterol, a partir da indução de eNOS nas plaquetas, o que culminaria na diminuição da ativação dessas células (HARAMAKI *et al.*, 2007; LAUFS, ULRICH; GERTZ; *et al.*, 2000). Outros estudos relacionam a rosuvastatina com a diminuição da expressão de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitory 1*) e o aumento da expressão de t-PA (*tissue-type plasminogen activator*), através do envolvimento da geranilgeranilação de Rho (DI *et al.*, 2005). Estudos relacionam a proteína t-PA como sendo crucial na clivagem de BDNF em sua forma madura, importante para a manutenção do mesmo em níveis séricos (JIANG *et al.*, 2017). Além disso, as estatinas são capazes de inibir o fator tissular expresso pelos macrófagos, reduzindo o potencial de formação de trombos na parede vascular (AIKAWA *et al.*, 2001).

Uma importante consideração acerca de estudos envolvendo a terapia a base de estatina é o potencial de efeitos adversos resultante do uso crônico dessa droga sobre os níveis de colesterol cerebrais, como, por exemplo, a possibilidade de tratamento profilático a base de estatinas para pacientes com alto risco de injúrias cerebrais pós-traumática (militares, atletas de esportes de alto impacto, por exemplo). Tais considerações são de caráter exploratório e necessitam de maior elucidação em estudos que examinem as consequências crônicas desse uso.

Justificativa

Assim como a MC, muitas outras doenças como acidente vascular cerebral (AVC), câncer, Parkinson, Alzheimer e até o processo natural de envelhecimento, são conhecidas pelo alto nível de radicais livres e estresse oxidativo que apresentam. Estudos sugerem que o estresse oxidativo, bem como o colesterol oxidado podem ser cruciais para o desenvolvimento da neuroinflamação e também na interação com a hipercolesterolemia periférica, favorecendo alterações no metabolismo do colesterol em âmbito cerebral (GAMBA *et al.*, 2015). Assim sendo, como forma de combater esses radicais livres derivados em cadeia no cérebro e possivelmente, reverter os danos cognitivos gerados, compostos como as estatinas despertam interesse farmacêutico para um possível desenvolvimento de um tratamento (AHN; CHOI, 2015; DARWISH *et al.*, 2014; MAHMOOD *et al.*, 2009).

Dentre as drogas utilizadas atualmente contra a malária, os antimaláricos tradicionais, tais como cloroquina, mefloquina e artemisina, por exemplo, não são completamente capazes de reverter e/ou atuar na progressão do dano cognitivo acarretado por ela. Nesse contexto e, tendo em vista que o agravante dos casos de malária são as injúrias cerebrais, o estudo e o desenvolvimento de agentes farmacológicos que atuem no âmbito cerebral é ideal para o controle da mortalidade causada por essa doença infecciosa (HIGGINS; KAIN; LILES, 2011; VIANNA, MONICA R M *et al.*, 2000). A terapia com estatinas foi demonstrada como benéfica em modelos experimentais de injúria cerebral pós-traumática durante a fase aguda/subaguda, as quais variam de 15 dias a 3 meses) (LIM, SHER WEI *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2004; MAHMOOD *et al.*, 2009; VONDER HAAR *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2015). Já outros estudos avaliam o poder da terapia combinada de estatinas com outras drogas, reportando efeitos sinérgicos resultante de tais combinações (DARWISH *et al.*, 2014; MAHMOOD *et al.*, 2008).

Nosso grupo já mostrou o efeito benéfico do tratamento com estatinas na reversão do desenvolvimento da sequela cognitiva associada a malária e a sepse (REIS *et al.*, 2012), porém os mecanismos de prevenção desta sequela ainda não estão completamente compreendidos, principalmente no que concerne o papel de pequenas GTPases Rho, Ras e Rac, cujo efeito biológico é dependente da prenilação/geranilgeranilação, que ocorre durante cascata de síntese de colesterol. Desta

forma, pretendemos neste estudo aprofundar nossa compreensão do mecanismo da prevenção do desenvolvimento da sequela cognitiva após a MC e os mecanismos associados a esse efeito pleiotrópico das estatinas, em especial, neste estudo, da rosuvastatina, a mais nova inibidora de HMG Co-A redutase, que exibe a capacidade inibitória da biossíntese de colesterol mais efetiva dentre as estatinas (MCTAGGART *et al.*, 2001).

Objetivos

1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo a avaliação do uso da rosuvastatina como estratégia terapêutica na prevenção e/ou reversão das sequelas cognitivas desencadeadas pelo modelo de malária cerebral experimental (MCE).

2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com rosuvastatina frente à MCE no que concerne ao(s):

Eventos associados à neuroinflamação:

- Avaliação da integridade da BHE;
- Produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como de ROS e RNS;
- Ativação da microglia e astrócitos;
- Alterações nas pequenas GTPases.

Fenômenos que caracterizam disfunção neuronal:

- Quantificação de proteínas pré e pós-sinápticas e vias de sinalização envolvidas na consolidação da memória;
- Avaliação de marcadores de neurodegeneração.

Desenvolvimento da sequela cognitiva:

- Avaliação do dano cognitivo através de análises comportamentais envolvendo memória espacial e aversiva.

Material e métodos

1. Animais

Foram utilizados de 5 a 10 camundongos machos da linhagem C57BL/6 por grupo experimental, com peso entre 18 e 20 gramas e idade de 3 a 4 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da FIOCRUZ/ ICTB sob licença CEUA L-025/15. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Centro de Experimentação Animal do Pavilhão Ozório de Almeida ou do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), ambos do Instituto Oswaldo Cruz. Os animais foram alocados em gaiolas plásticas de microisoladores ventilados, em temperatura ambiente, com livre acesso à ração e água e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

2. Manutenção das cepas e infecção dos animais

A cepa de *Plasmodium beghei* ANKA (PbA) foi mantida através da coleta de sangue de camundongos machos da linhagem C57BL/6, com peso entre 18 e 20 gramas e idade de 3 a 4 semanas, doadores com aproximadamente 10% de parasitemia e congelada em nitrogênio líquido, após centrifugação e substituição do plasma pela solução de congelamento. O sangue foi coletado e centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos para separar as hemácias do plasma. Posteriormente, foi substituído por uma solução tamponada de glicerolito para que o sangue pudesse ser congelado. Para os experimentos, sangue foi coletado de camundongos com 10% de parasitemia, denominados animais passagem, e foi utilizado na infecção do grupo experimental. Em cada animal foram inoculados intraperitonealmente 0,2 ml de uma suspensão contendo 10^6 hemácias parasitadas diluídas em PBS. Para o grupo controle, os animais foram infectados com 10^6 hemácias não parasitadas diluídas em PBS.

3. Avaliação da parasitemia

No sexto dia de infecção, foi feito um pequeno corte na ponta do rabo dos camundongos para a coleta de uma gota de sangue, afim de avaliar a parasitemia desses animais. O sangue foi colocado em lâminas foscas lapidadas próprias para a realização de esfregaços sanguíneos, as quais foram posteriormente coradas através do kit Panótico Rápido. As lâminas coradas foram levadas a um microscópio óptico sob óleo de imersão em aumento de 100 x para a contagem da parasitemia dos animais.

4. Avaliação do escore clínico de gravidade da doença

No sexto dia de infecção os camundongos tiveram a evolução da doença avaliada clinicamente pelo escore de gravidade de malária, derivado do protocolo SHIRPA (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital Phenotype Assessment*) (ROGERS *et al.*, 1997). Nesse teste são avaliados parâmetros físicos e comportamentais indicadores da gravidade. São eles a ausência ou presença de piloereção, corpo arqueado, lacrimação, força, andar vacilante, convulsões, paralisia de patas, estado presente ou ausente de coma, alteração na taxa de respiração, alteração nos batimentos cardíacos, alteração da temperatura corporal, presença ou ausência do fechamento de pálpebras, interesse pelo ambiente, escape ou não ao toque e perda ou não de tônus corporal, abdominal e de membros. Se o parâmetro em questão se mostrar presente no animal, ele acumula 1 ponto no escore total, porém, se o parâmetro for ausente, ele assume valor 0. A partir de 4 pontos no escore total, a malária já assume gravidade suficiente para ter atingido tecidos cerebrais com possível comprometimento neurológico, ou seja, o animal apresenta um quadro de MC . O controle também foi avaliado de modo a confirmar a ausência de interferências externas no experimento. (REIS *et al.*, 2012).

5. Grupos experimentais e tratamento

Os camundongos da linhagem C57BL/6 infectados ou não foram divididos em 3 grupos experimentais da seguinte forma: 1 grupo não infectado tratado com salina (RBC), 1 grupo infectado tratado com salina (PbA) e 1 grupo infectado tratado com rosuvastatina (PbA + Rosu). A partir dos primeiros sinais de MC, o tratamento foi realizado e perdurou por mais 7 dias.

A fim de avaliar a reversão do desenvolvimento do dano cognitivo, aos animais foi administrada a droga de interesse rosuvastatina (10, 20 e 40 mg/kg via intragástrica). Os animais foram pesados em balança analítica e em seguida fez-se uma solução de rosuvastatina diluída em PBS nas doses de 10 a 40 mg/kg de peso corporal. Foram administrados 200 µL da solução via intragástrica utilizando uma agulha curva de gavagem de metal com calibre de 22 gauge onde a mesma é presa em uma seringa de um mililitro e introduzida na boca do animal. Para recuperar os animais dos efeitos deletérios da malária, os animais destinados às análises cognitivas foram tratados com o antimalárico comercial cloroquina (25mg/kg via intragástrica) também utilizando uma agulha curva de gavagem de metal com calibre de 22 gauge presa em uma seringa de um mililitro e a introduzindo na boca do animal.

Diferentes grupos de animais, divididos entre os 3 grupos experimentais, foram eutanasiados nos 6º e 15º dia após a infecção para que análises bioquímicas e moleculares de cérebro total ou regiões de interesse, como córtex e hipocampo, pudessem ser realizadas.

6. Avaliação do edema cerebral através de injeção retro-orbital (Ensaio de Azul de Evans)

Os camundongos da linhagem C57BL/6 infectados ou não foram anestesiados por meio do anestésico inalatório isoflurano (5%). Com o auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha de 27 gauge, foi realizada nesses animais a injeção retro-orbital de 0,2 ml da solução do corante Azul de Evans (2%) diluído em PBS. Após o intervalo de 1 hora, os animais foram eutanasiados e a perfusão extracorpórea com salina foi realizada para a coleta do tecido cerebral. O material foi colocado em 3 mL de formamida para que o corante fosse extraído em estufa a 37°C por 24 h. Após este intervalo, foi determinada

uma curva padrão do corante para determinação da concentração e a leitura do experimento foi realizada em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 620 nm.

7. Coleta das amostras

7.1 Punção ocular para obtenção de sangue

No sexto dia de infecção, os animais foram anestesiados por meio do anestésico inalatório Isofurano (5%), de modo já descrito acima. Com o auxílio de uma pinça curva o sangue foi coletado por via ocular, alocado em tubos *ependorf*. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm em centrífuga clínica por 10 minutos. O soro foi coletado e estocado no freezer -80°C.

7.2 Perfusão extracorpórea para obtenção do tecido cerebral

No sexto dia de infecção, por meio do anestésico inalatório Isofurano (5%), de modo já descrito acima. A quantidade utilizada não é suficiente para que o animal venha a óbito. A seguir fez-se uma incisão na região peritoneal onde estende-se até a caixa torácica para expô-la. Foi colocado um escalpe de calibre 21 gauge conectado a salina estéril e introduziu-se a agulha no ventrículo esquerdo do coração do animal. A válvula foi aberta para que o fluxo de salina fosse incorporado a circulação do animal e posteriormente cortou-se a artéria aorta abdominal. Quando o fígado apresentou uma tonalidade bege claro o fluxo de salina foi interrompido. Após eutanásia do animal, o cérebro foi retirado a partir da abertura da caixa craniana com uma tesoura de ponta fina. Retirou-se o cérebro com o auxílio de uma pinça de relojoeiro. O cérebro total ou as regiões cerebrais, dependendo do ensaio a que tenham se destinado, foram colocadas dentro de tubos para criopreservação e estocados no freezer -80°C e a carcaça do animal dispensada em sacos de resíduos de material biológico. Posteriormente o tecido cerebral foi processado para diversos ensaios.

8. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) cerebral

Após a perfusão dos animais, cada hemisfério dos cérebros extraídos foi pesado de modo que a solução de homogeneização (PBS-EDTA 5 μ M + Brometo de cetildimetilamônio 0,5% (HTAB)) pudesse ser feita. Para cada 50 mg de tecido cerebral 100 μ L de solução de homogeneização foi usada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 4000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante das amostras foi separado e, então, centrifugado novamente a 4°C por 1200 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante final foi coletado e adicionado aos reagentes em placa de fundo curvo para reação por 30 minutos à 37°C. 50 μ L do sobrenadante de cada amostra foi adicionado à 50 μ L da solução de homogeneização e 50 μ L de solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL) e incubados por 30 minutos em estufa a 37°C. Após esse intervalo, foram adicionados 50 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,006%) e incubou-se por mais 10 minutos. 200 μ L do conteúdo que havia na placa foram transferidos para uma nova placa agora com fundo chato. A leitura do experimento foi realizada em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 460 nm. O cálculo foi realizado a partir do valor da absorvância/peso das amostras cerebrais.

9. Processamento das amostras cerebrais para os ensaios bioquímicos e moleculares

O tecido cerebral extraído após a perfusão dos animais foi processado através de soluções de homogeneização próprias para cada ensaio a serem destinados e com quantidades compatíveis para qual fosse a região cerebral de interesse. As amostras destinadas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) foram homogeneizadas com tampão de lise contendo Triton (1%) e inibidor de protease (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* – Roche) na proporção de 1 pastilha a cada 50mL de solução. Já as amostras destinadas aos ensaios de Western blotting e Dot blot foram homogeneizadas com tampão de lise RIPA (Tris-HCl 50mM; 150 mM de NaCl; Triton 1%; Deoxicolato de Sódio 0,5%; SDS 0,1%, EDTA 1mM; Ortovanadato de sódio 1mM; pH 7,5-8,0) acrescido de inibidores de protease (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* – Roche) e fosfatase (*PhosSTOP™* - Sigma Aldrich), ambos na proporção de 1 pastilha a cada 50mL de solução. Para a região do

córtex cerebral foram utilizados 600µL de solução de homogeneização; para a região do hipocampo, 300 µL e para cada hemisfério cerebral, 500µL.

9.1 Dosagem de proteínas (método BCA)

A dosagem de proteínas foi realizada através do método BCA (*Pierce, Thermo Scientific, EUA*). As amostras cerebrais previamente processadas foram diluídas 10 x numa solução de PBS e BHT (hidroxitolueno butilado - *butylated hydroxytoluene*) (0,2 %), sendo assim, 10 µL de cada amostra foi adicionado em 90 µL de PBS/BHT. 10µL das amostras previamente diluídas foram adicionados em placas 96 poços de fundo chato e, posteriormente, adicionados 190 µL do reagente disponibilizado no kit pelo fabricante. Para cada cinquenta partes do reagente A uma parte do reagente B era adicionado. Para a curva padrão (de 0,01562 a 2 mg/mL), albumina humana disponibilizada no kit pelo fabricante foi usada e aplicada na placa através de diluições seriadas. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos e a leitura do experimento foi realizada em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 562 nm.

10. Dosagem de citocinas através de ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA)

A avaliação do perfil de citocinas geradas foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA sanduíche a partir do kit *R&D dual set*. Primeiramente, placas de 96 poços de fundo chato em volume reduzido foram incubadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina diluído em PBS (50µL/poço) e mantidas a 4°C *overnight* seladas com plástico filme. Após 4 lavagens com solução tampão (PBS acrescido de Tween® a 0,05%) (100µL/poço), as placas foram bloqueadas com solução de PBS [1x] e 1% de albumina sérica bovina-BSA (Sigma Aldrich) (100 µL/poço) e incubadas por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, após 4 lavagens com solução tampão, as amostras do tecido cerebral, soro e curva padrão foram incubadas (50µL/poço) e mantidas a 4°C *overnight* seladas com plástico filme .

Para a curva padrão, anticorpos recombinantes para as citocinas TNF- α e IFN- γ foram incubados em duplicatas a partir de diluição seriada com tampão de bloqueio acrescido de Tween® (0,05%). Após 4 lavagens com solução tampão, anticorpos de detecção biotinilados diluído em tampão de bloqueio acrescido de Tween® (0,05%) (50 μ L/poço) foram adicionados e a placa mantida em temperatura ambiente por 1h. Em seguida, após 6 lavagens com solução tampão, a enzima streptavidina-peroxidase (*R&D dual set*) (50 μ L/poço) foi adicionada e a placa mantida em temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. Novamente, após 8 lavagens com solução tampão, a solução de substrato 3,3'-5,5' Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich) foi adicionada e a placa incubada por 15 minutos. A solução de parada da reação (H₂SO₄ 2N) (50 μ L/poço) foi adicionada ao final do tempo de incubação. A leitura do experimento foi realizada em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 405nm.

11. Western blotting (WB)

Após a dosagem de proteínas realizada através do método BCA, como descrito previamente, as amostras foram preparadas para o ensaio através da diluição em tampão apropriado para amostra na proporção de 1:1 de modo que a concentração final de proteínas em cada poço do gel fosse igual a 50 μ g/ 15 μ l (7,5 μ L de amostra diluída em água Milli-Q® + 7,5 μ L de tampão de amostra a base de β -mercaptoenol).

Para realização do ensaio de *Western blotting*, foi utilizado o protocolo segundo o manual fabricante *Odyssey system*[™] (Li-Cor, Biociences, EUA). Aplicou-se 5 μ l do padrão de peso molecular (*RAINBOW Odyssey system*[™] - Li-Cor, Biociences). Em seguida, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese (em gel de poliacrilamida 12-15%) com a aplicação de 110 V por duas horas e em seguida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (*Odyssey system*[™] - Li-Cor, Biociences, EUA), utilizando tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 190 mM; pH 8,3) acrescido de metanol (20 %). A transferência foi realizada a 400 A por 120 minutos em sistema molhado. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueio (Albumina Sérica Bovina – *Bovine Serum Albumin*) a 5% diluída em TBS (Tris 10mM; NaCl 150mM; pH 8,0) e 0,05% Tween®. Posteriormente, foi incubada *overnight* no escuro com anticorpo primário específico para as proteínas de interesse diluído em solução de bloqueio e TBS Tween® na

proporção de 1:1. Para a avaliação das células gliais, foram utilizados os anticorpos *mouse* anti-GFAP (1:1000, Abcam) e *mouse* anti-Iba-1 (1:500, Abcam). Para a avaliação das Gtpases, foram utilizados os anticorpos *rabbit* anti-Rac 1 (1:1000, Abcam) e *rabbit* anti-Rho (1:1000, Abcam). Para a avaliação da função sináptica, foram utilizados os anticorpos *rabbit* anti-PSD-95 (1:1000, Abcam), *mouse* anti-Sinaptofisina (1:500, Abcam), *rabbit* anti-pERK 1/2 (1:500, Abcam) e *rabbit* anti-BDNF (1:500, Abcam). Para a avaliação da isoforma neuronal da enzima NOS, foi utilizado o anticorpo *rabbit* anti-nNOS (1:500, Abcam). As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana por meia hora, com os anticorpos secundários (*goat anti-rabbit IgG* e *goat anti-mouse IgG* - Li-Cor, Biociences) diluídos em TBS Tween®. As membranas foram escaneadas e a detecção das bandas foi feita através da densitometria com auxílio do software *Odyssey Infrared Imaging system*®.

12. Dot blot (DB)

Após a dosagem de proteínas realizada através do método BCA, como descrito previamente, as amostras foram preparadas para o ensaio através da diluição em água Milli-Q® de modo que a concentração final de proteínas em cada poço da placa fosse igual a 0,1 µg/µl.

O ensaio de Dot blot foi realizado com o auxílio do aparato *Bio-dot*® *Microfiltration Apparatus* (Bio-Rad) com 96 poços seguindo as orientações contidas no manual disponibilizado pelo fabricante. Conforme as instruções, o aparato foi montado juntamente com a membrana de nitrocelulose com poro de 0,45µm (*Odyssey system*™ - Li-Cor, Biociences, EUA) previamente permeabilizada por 5 minutos em TBS. Após a montagem, a membrana foi novamente hidratada com TBS (100 µL/poço) e a válvula de vácuo foi ajustada de modo a liberar o fluxo de ar. Posteriormente, as amostras de tecido cerebral e soro (100 µL/poço), em duplicata, foram incubadas e mantidas por 40 minutos a temperatura ambiente seladas com plástico filme, de modo que ocorresse a filtração passiva através da membrana. Após esse intervalo, a válvula do aparato foi ajustada de modo a permitir o vácuo e, com o auxílio de uma bomba de vácuo, as amostras foram drenadas. O aparato foi removido e a membrana foi incubada por 1 hora com solução bloqueio (Albumina Sérica Bovina – *Bovine Serum Albumin*) a 5% diluída em TBS e 0,05% Tween®. Posteriormente, foi incubada *overnight* no escuro com anticorpo primário específico

para as proteínas de interesse diluído em solução de bloqueio e TBS Tween® na proporção de 1:1. Para a avaliação dos subprodutos da peroxidação lipídica, foram utilizados os anticorpos *mouse* anti-4-HNE (1:1000, Abcam) e *mouse* anti-Nitrotirosina 3 (1:500, Abcam). De modo a normalizar as análises, foi utilizado o anticorpo primário *mouse* anti- β actina (1:10.000, Abcam). As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana por meia hora, com os anticorpos secundários *goat anti-mouse IgG* (Li-Cor, Biociences) diluídos em TBS Tween®. As membranas foram escaneadas e a detecção dos *spots* foi feita através da densitometria com auxílio do software *Odyssey Infrared Imaging system*®.

13. Testes comportamentais

13.1 Freezing

O teste freezing foi realizado com o objetivo de avaliar danos na capacidade cognitiva associado à resposta ao medo condicionado. Na sessão treino, os camundongos são colocados na caixa experimental a explorar por 5 minutos. Após esse tempo, recebem um choque de 0,6 mA por 3 segundos e, 30 segundos após o primeiro choque, os animais são submetidos a outro choque de mesma intensidade e duração. Na sessão teste, os camundongos voltam a caixa experimental sem receber choque e, é observado, então, o tempo em que os animais ficam parados mediante a iminência de um possível choque. O intervalo entre as sessões treino e teste é de 24 horas (IZQUIERDO, IVAN; FURINI; MYSKIW, 2016; RUSTAY; BROWMAN; CURZON, 2008).

13.2 Labirinto Aquático de Morris (Water maze)

O teste Labirinto aquático de Morris foi utilizado para a avaliação cognitiva de memória espacial. Durante o ensaio, os animais foram colocados em uma piscina com diâmetro de 1,04 m e com altura de 55 cm. A piscina foi dividida em 4 quadrantes, sendo que em um deles foi colocada uma plataforma de acrílico com as dimensões de 13 x 30 x 13 cm submersa. Os animais foram treinados por 4 dias, em sessões de 60 segundos, a aprenderem o caminho até a plataforma. O tempo transcorrido até chegada do animal

à plataforma (tempo de latência) foi registrado. No último dia (5°), a plataforma foi retirada e o tempo, em 60 segundos, gasto pelos camundongos no quadrante em que a mesma se encontrava foi anotado (MORRIS, 1984).

14. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados com o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, inc.). Foram realizadas análises descritivas de média, desvio-padrão, erro padrão da média. Para a análise da sobrevivência dos animais foi utilizado o teste Log-Rank (Mantel Cox). Para as demais análises foi utilizada a comparação entre as variâncias em torno da média dos grupos, feita pelo teste de ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos valores menores ou iguais a $p < 0,05$.

Resultados

1. Rosuvastatina não foi capaz de diminuir a carga parasitária dos animais infectados com PbA e não impede o desenvolvimento da MC

No presente estudo, o modelo experimental de malária cerebral em camundongos machos C57BL/6 infectados com PbA foi utilizado de modo a avaliar o papel do tratamento com rosuvastatina nos eventos envolvidos na patogênese da MC. Iniciamos as análises quanto ao escore de gravidade de malária, protocolo que relaciona parâmetros físicos e comportamentais indicadores da gravidade da doença; à parasitemia, realizada a partir de esfregaço sanguíneo e avaliada a partir de contagem em microscópio óptico; e da curva de sobrevivência, que consistiu no acompanhamento da mortalidade dos animais. Para tal, os animais foram divididos nos grupos PbA, o controle infectado; PbA+Rosu, animais infectados e tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina; e RBC, o controle não infectado. Os animais PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, e os animais do grupo PbA+Rosu foram tratados a partir dos primeiros sinais da doença.

No 6º dia pós infecção, os camundongos infectados com PbA exibiram claramente sinais de malária grave. Na **Figura 1A**, é possível notar escore de gravidade superior a 4 no 6º dia pós infecção, mais especificamente com média de 10,5 entre os animais do grupo, o qual é indicativo de malária grave. Os animais tratados com 10 mg/kg de rosuvastatina, por sua vez, apresentaram média de 4,8 no escore de gravidade, resultando numa redução significativa com relação aos animais PbA, mas, ainda assim, o quadro de malária grave não foi comprometido.

O percentual médio de parasitemia dos animais no 6º dia pós infecção, como demonstrado pela **Figura 1B**, variou em torno de 20%. Dentro de cada grupo, o desvio padrão foi de ± 5 entre os animais. Rosuvastatina não alterou os níveis de parasitemia nos animais com relação ao grupo PbA. Da mesma forma, como demonstrado pela **Figura 2**, o tratamento com rosuvastatina não apresentou efeito algum quanto à mortalidade dos animais. No 6º dia pós infecção, tanto os animais PbA quanto os animais PbA tratados com 10 mg/kg de rosuvastatina apresentaram mortalidade mais expressiva, no qual 40% desses animais morreram. Portanto, essa foi a dose de rosuvastatina selecionada para o tratamento nas análises seguintes.

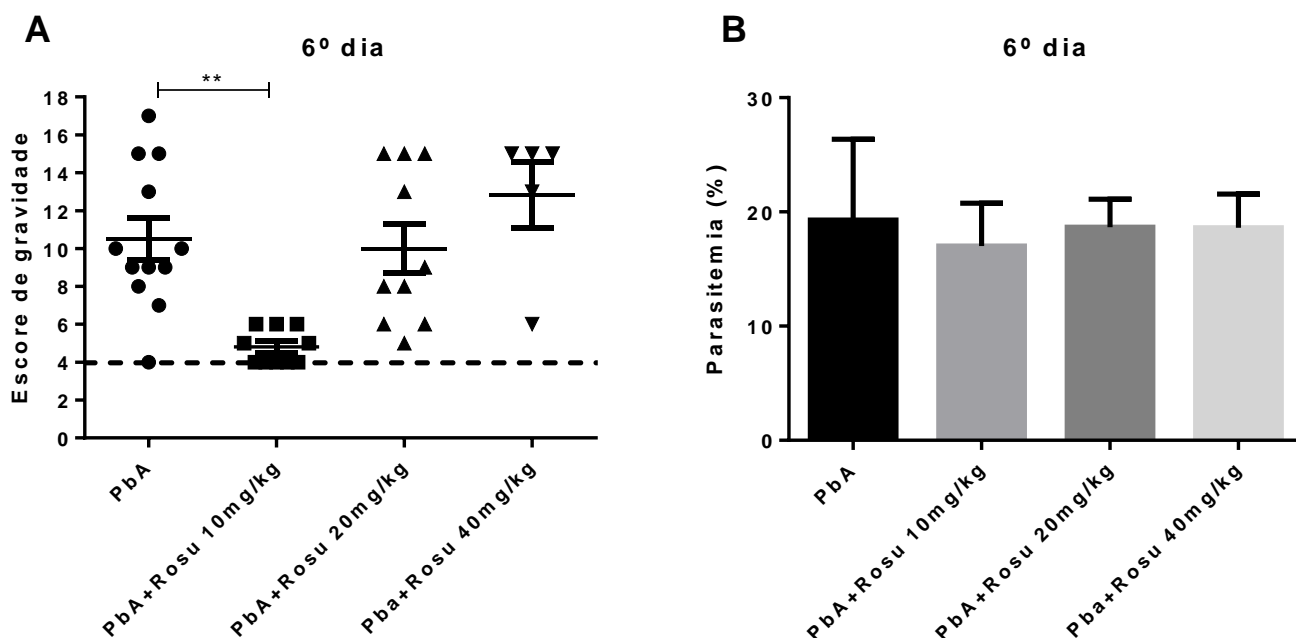


Figura 1. Avaliação do escore de gravidade e da parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10-40 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg), 20 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 20 mg/kg) e 40 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 40 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. Os sintomas clínicos que caracterizam o estabelecimento de malária grave (**1A**) e a parasitemia (**1B**) foram avaliados após o 6º dia de infecção. ** $p < 0,01$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 3 experimentos).

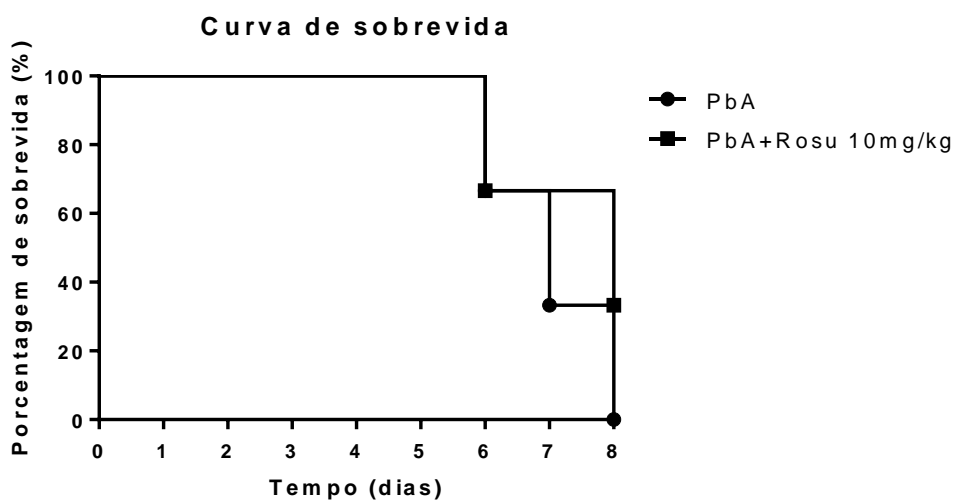


Figura 2. Avaliação da curva de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o fim da análise da sobrevivência dos animais, que foi avaliada até o 8º dia de infecção com PbA. Não houve diferença estatística entre os grupos (Teste Log-Rank Mantel-Cox). (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 3 experimentos).

2. Rosuvastatina a 10 mg/kg reduz a permeabilidade da BHE ocasionada pela infecção com PbA

Uma vez que a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina não foi capaz de alterar a mortalidade dos animais infectados, não interferindo no desenvolvimento da malária grave, mas, ainda assim, atenuando significativamente os sintomas relacionados à doença, as análises seguintes foram realizadas utilizando essa dose previamente testada.

Ainda no 6º dia pós infecção, foram avaliados aspectos condizentes com a neuroinflamação. A disfunção da BHE é um fenômeno amplamente observado em casos de MC. A mudança na estrutura e função da BHE e, conseqüentemente a sua permeabilização, é característica da MC tanto observada em humanos como experimentalmente (BROWN *et al.*, 2001; POH; HOWLAND; GROTENBREG, 2014). Para tal, foi utilizado o ensaio de Azul de Evan, no qual a partir da injeção de um corante que possui afinidade com a albumina circulante (HUNT *et al.*, 2014), o cérebro dos animais infectados tratados e não tratados se tornam suscetíveis à análise quanto ao extravasamento do mesmo. Para o procedimento, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

Como demonstrado pela **Figura 3**, os animais PbA exibiram maior internalização do corante para o interior da sua microvasculatura cerebral, com uma O.D. média de 0,84 entre os animais do grupo, em comparação com animais RBC, que apresentaram O.D. média em torno de 0,24 entre os animais do grupo. Ou seja, os animais PbA exibiram uma permeabilidade vascular três vezes e meia maior do que em comparação com os animais RBC. Todavia, o extravasamento do corante foi minimizado, de forma significativa, a partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina.

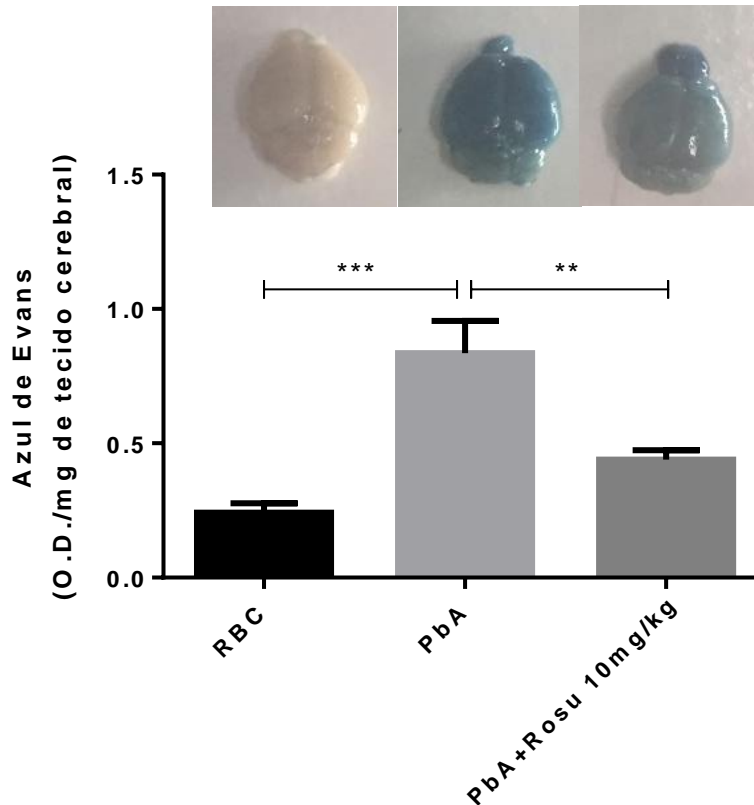


Figura 3. Ensaio de Azul de Evans em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) foi avaliada através do ensaio de Evan. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

3. Rosuvastatina diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro e hipocampo de animais com MC.

A patogênese da MC está associada, dentre outros fatores, a montagem de resposta inflamatória relacionada a presença do parasita, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias (DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017; HUNT; GRAU, 2006). Tais citocinas são críticas para o controle da infecção, porém, a alta produção e secreção das mesmas está relacionada à injúrias teciduais, sobretudo sequelas cognitivas (HUNT *et al.*, 2014; HUNT; GRAU, 2006). Sendo assim, uma vez verificado o aumento da permeabilidade e disfunção da BHE causada através do processo infeccioso

desencadeado pela malária grave, o padrão de citocinas no tecido cerebral pode sofrer modificações e favorecer a injúria. Desse modo, ainda no 6º dia pós infecção, avaliamos a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ que desempenham papel importante na fisiopatologia da MC (HUNT *et al.*, 2014; KINRA, P. AND DUTTA, 2013; TOSEVSKI *et al.*, 2017).

TNF- α e IFN- γ foram avaliadas através do ensaio de ELISA no soro e no hipocampo dos animais, estrutura cerebral relacionada com os processos de formação e consolidação da memória. Para isso, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

A partir da **Figura 4A** é possível notar que os animais PbA apresentaram grande quantidade de TNF- α a níveis séricos, com uma média de aproximadamente 1,35 ng/ml. A produção de TNF- α foi significativamente diferente em comparação com a avaliada a níveis séricos dos animais RBC, que em média, apresentaram 0,2 ng/ml de TNF- α no soro. A partir do tratamento com rosuvastatina, os níveis de TNF- α foram revertidos significativamente, onde os animais apresentaram, em média, 0,74 ng/ml no soro dessa citocina. De forma semelhante, como demonstrado na **Figura 4B**, os animais PbA também apresentaram produção significativamente maior de IFN- γ a níveis séricos quando em comparação com os animais RBC. No soro de animais PbA, IFN- γ apresentou-se com uma média de 0,74 ng/ml, aumento significativamente diferente em comparação com os animais RBC, os quais exibiram, em média, 0,2 ng/ml de IFN- γ . Contudo, a partir do tratamento com rosuvastatina, a média de IFN- γ no soro dos animais diminuiu significativamente para 0,2 ng/ml.

No hipocampo, como demonstrado pela **Figura 4C**, é possível notar um aumento de, aproximadamente, três vezes mais dos níveis de TNF- α nos animais PbA quando comparados com os animais RBC. Porém, o tratamento com rosuvastatina não foi capaz de revertê-lo. Já na **Figura 4D**, os níveis aumentados de IFN- γ no hipocampo dos animais PbA, em média de 3,4 ng/ml, apresentaram diferença significativa quando comparados com os animais RBC, que exibiram em média 2,8 ng/ml. Nota-se que a média de IFN- γ encontrada dentre os grupos foi bem próxima, mas o desvio padrão foi quase inexistente. A partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina o quadro foi revertido e os níveis de IFN- γ diminuíram a níveis próximos ao dos animais RBC, com média de 2,4 ng/ml.

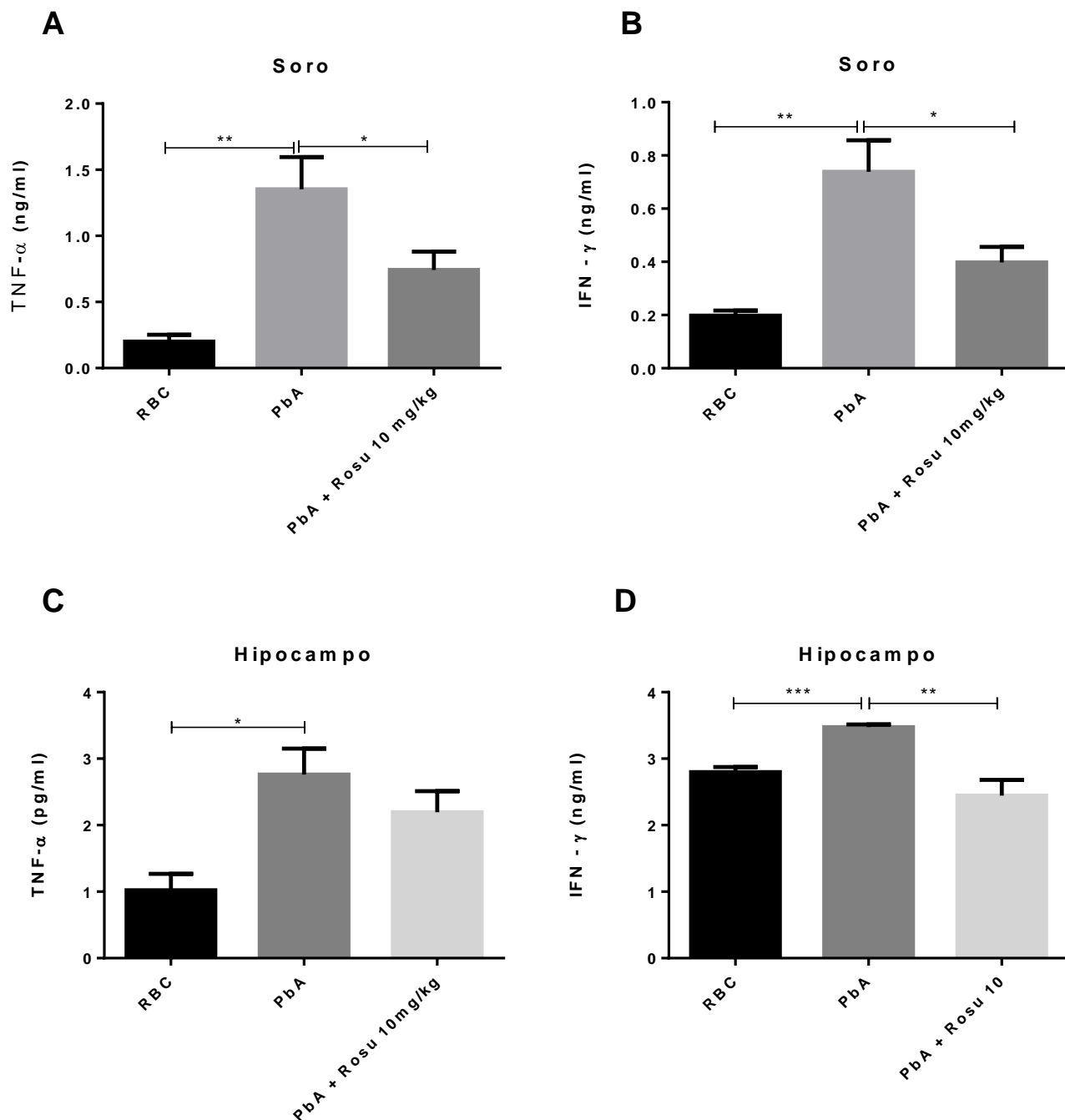


Figura 4. Avaliação da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6^o dia pós infecção, quando a produção de TNF- α e IFN- γ foi avaliada por Elisa no soro (4A e 4B) e no hipocampo (4C e 4D). *p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001 pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 2 experimentos).**

4. Rosuvastatina diminui a atividade de mieloperoxidase no cérebro de animais com MC

IFN- γ é um importante ativador principalmente de neutrófilos, os leucócitos mais abundantes na circulação. Esses, quando ativados, liberam proteases e mieloperoxidase (MPO), as quais contribuem para a progressão da doença (OTTERDAL *et al.*, 2018). A mieloperoxidase é uma heme peroxidase presente nos grânulos de neutrófilos que auxilia no combate a patógenos. Essa enzima atua através da geração de espécies oxidantes, sendo normalmente, benéfica para o organismo. No entanto, estímulos inapropriados podem levar a geração de uma alta quantidade de espécies reativas nos sítios inflamatórios, o que pode ocasionar danos teciduais.

Sendo assim, ainda no 6º dia pós infecção a avaliação de MPO foi avaliada no tecido cerebral total dos animais através de ensaio colorimétrico, de modo a avaliar a atividade da heme peroxidase frente à alteração da dinâmica cerebral causada pela infecção com PbA. Para isso, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

Como demonstrado pela **Figura 5**, a infecção com PbA gerou uma atividade significativamente maior de MPO no tecido cerebral dos animais quando comparado com os animais não infectados RBC. Os animais PbA apresentaram, em média, 0,01 nmol/mg de MPO, enquanto os animais RBC apresentaram, em média, 0,002 nmol/mg. Assim sendo, a infecção por PbA aumentou a atividade de MPO em cinco vezes. O tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina foi capaz de diminuir significativamente essa atividade a níveis semelhantes aos observados nos animais RBC, com média de 0,001 nmol/mg entre os animais do grupo.

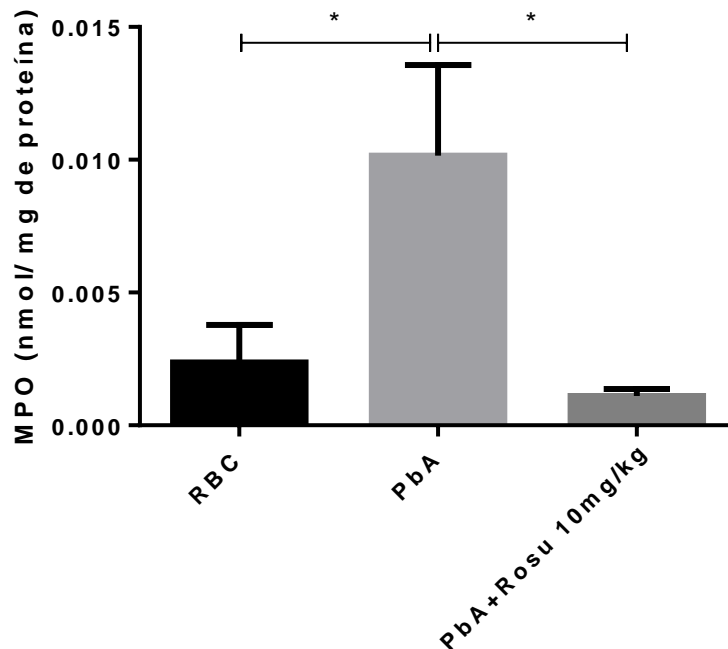


Figura 5. Avaliação da atividade de mieloperoxidase em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a atividade de mieloperoxidase foi avaliada no tecido cerebral total. * $p < 0,05$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

5. Rosuvastatina é responsável pela reversão da microgliose e astrogliose nesse modelo de MC

O comprometimento da integridade da BHE e a consequente neuroinflamação característica da MC afetam diretamente a dinâmica celular cerebral, como por exemplo, a distribuição e propriedades de astrócitos e microglia, células componentes do parênquima cerebral (HUNT; GRAU, 2006). Além disso, tais células quando ativadas, são responsáveis por alimentar esse processo com a produção de citocinas pró-inflamatórias e contribuir para o aumento da atividade de MPO, atuando não só para a resposta imune contra o parasita, como também para a seqüela cognitiva (HUNT; GRAU, 2006; RAY; KATYAL, 2016).

Desse modo, ainda no 6º dia pós infecção a avaliação das células gliais foi avaliada no tecido cerebral total dos animais através da técnica de Western Blotting. Para

isso, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

A **Figura 6A** mostra a expressão da proteína Iba-1 e a **Figura 6B**, da proteína GFAP. Essas proteínas caracterizam, respectivamente, a microgliose e a astrogliose. A microglia é uma célula com importante papel em desordens neurológicas. Em condições normais a microglia apresenta-se rica em ramificações, assumindo um perfil pouco ou não ativado. Devido ao processo de neuroinflamação característico de patologias neurológicas, a microglia passa a apresentar sua forma ativa, com perfil pró-inflamatório. Da mesma forma, os astrócitos, população de célula glial do SNC, respondem aos insultos teciduais através da sua forma ativa, também com um perfil pró-inflamatório (GLASS *et al.*, 2010; ISABELLE M. MEDANA, 1997).

Os animais PbA exibiram maior expressão, significativamente diferente, das proteínas Iba-1 quando comparados com os animais RBC. Na **Figura 6A**, é possível verificar que a microgliose nos animais PbA é aproximadamente três vezes maior do que nos animais RBC, uma vez que apresentaram uma densitometria média de 2,7, enquanto os animais RBC apresentaram densitometria média de 0,7. Esse quadro é característico da patologia de MC. A partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina a ativação da microglia é revertida a níveis semelhantes ao visto nos animais RBC e a densitometria média entre os animais do grupo é de 0,8.

Com relação à astrogliose, a **Figura 6B** demonstra que os animais PbA também exibem maior ativação dos astrócitos com relação aos animais RBC. A infecção com PbA elevou a densitometria de GFAP para, em média, 1,5; já a densitometria média entre os animais RBC foi de 0,5. Ainda que o desvio padrão entre os animais PbA tenha sido de aproximadamente 1, a diferença com relação aos animais RBC foi significativamente diferente. Contudo, o tratamento com rosuvastatina foi capaz de diminuir essa ativação significativamente quando comparado aos animais PbA.

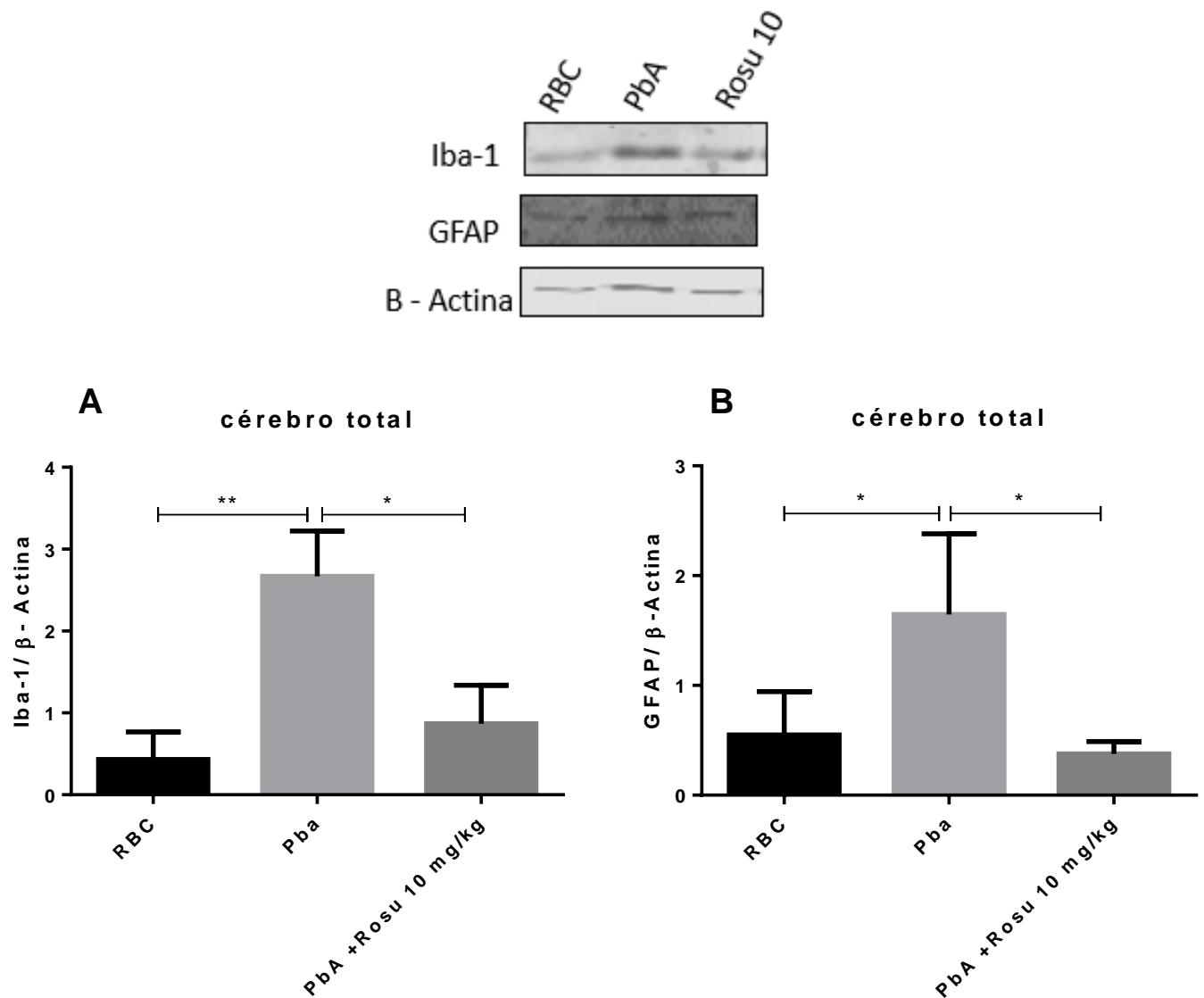


Figura 6. Avaliação da microgliose e astrogliose em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão das proteínas Iba-1 (6A) e GFAP (6B) foram avaliadas por Western blotting no tecido cerebral total. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

De modo a corroborar com os achados quanto à astrogliose, ainda no 6º dia pós infecção o conteúdo da proteína S100 β foi avaliada no tecido cerebral total dos animais através ensaio de ELISA. Para esse procedimento, os animais foram submetidos ao mesmo desenho experimental até então.

A **Figura 7** mostra os níveis de S100 β , proteína ligante de cálcio que está presente no citoplasma de astrócitos perivasculares (THELIN *et al.*, 2016). Além disso, é um marcador de reatividade glial, uma vez que quantidades expressivas dessa proteína são vistas em pacientes que sofreram algum tipo de trauma cerebral e, até mesmo, em quadros de malária grave (INGEBRIGTSEN; ROMNER; KOCK-JENSEN, 2000; MEDANA; IDRO; NEWTON, 2007; THELIN *et al.*, 2016). É possível observar que em animais PbA, S100 β encontra-se duas vezes mais expressa quando comparado com os animais RBC. Essa diferença é significativamente diferente. Esse quadro foi revertido, de forma significativa quando comparado com os animais PbA a partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina, que diminui a expressão da proteína a níveis semelhantes aos observados nos animais RBC.

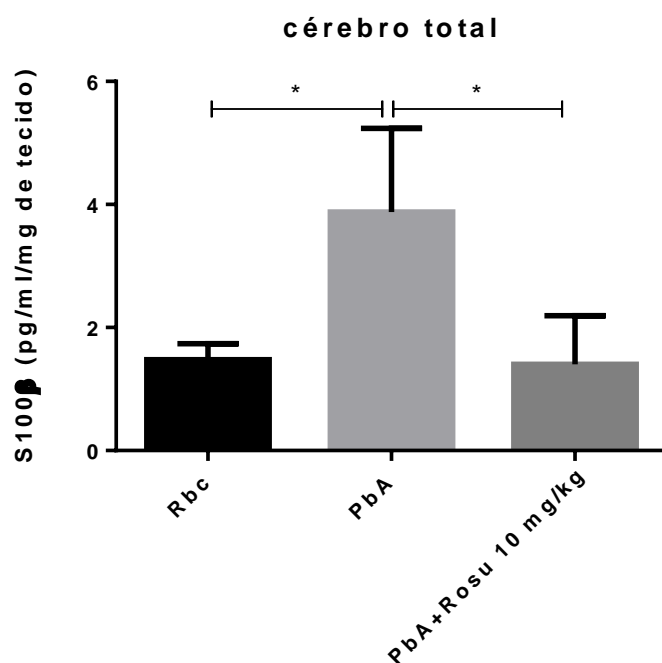


Figura 7. Avaliação da produção de S100 β em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando os níveis da proteína S100 β foram avaliados por Elisa no tecido cerebral total. * $p < 0,05$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

6. Rosuvastatina atua na inibição do estresse oxidativo no hipocampo e córtex de animais infectados com PbA

Uma vez que o cenário de neuroinflamação e consequente ativação de células da glia são frequentemente associados com o aumento da neurotoxicidade principalmente a partir do estresse oxidativo (GLASS *et al.*, 2010), foram avaliados, ainda no 6º dia pós infecção, nas estruturas cerebrais hipocampo e córtex, os subprodutos da peroxidação lipídica e da nitrosilação de proteínas.

Através da técnica de Dot Blot, foi realizada a marcação de Hidroxinonenal (HNE) e 3-Nitrotirosina (NT-3), subprodutos da peroxidação lipídica e nitrosilação de proteínas, respectivamente. Ambos são marcadores reconhecidos de estresse oxidativo e característicos da malária cerebral aguda (SOUZA *et al.*, 2018). Para isso, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

A partir da **Figura 8A**, é possível observar que a infecção com PbA aumentou aproximadamente o dobro da peroxidação lipídica quando em comparação com o apresentado pelos animais RBC. Os animais PbA apresentaram uma densitometria de, em média, 2,5; já os animais RBC, 1,3. Entretanto, o tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina reduziu os níveis de HNE no hipocampo significativamente com relação ao observado nos animais PbA a níveis semelhantes dos animais RBC. Como demonstrado pela **Figura 8B**, esse efeito também pode ser observado no córtex desses animais. Em ambas estruturas cerebrais, é notável que os animais PbA apresentam maiores níveis de HNE significativamente diferente dos animais RBC.

De forma semelhante, tanto no hipocampo como no córtex, os animais PbA exibem maiores níveis de NT-3, significativamente diferente, com relação aos animais RBC, é o demonstrado nas **Figuras 9A e 9B**, respectivamente. Porém, como mostra a **Figura 9B**, a nitrosilação de proteínas no córtex dos animais PbA foi aproximadamente duas vezes maior do que nos animais RBC e o tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina foi capaz de reduzir os níveis de 3- Nitrotirosina significativamente.

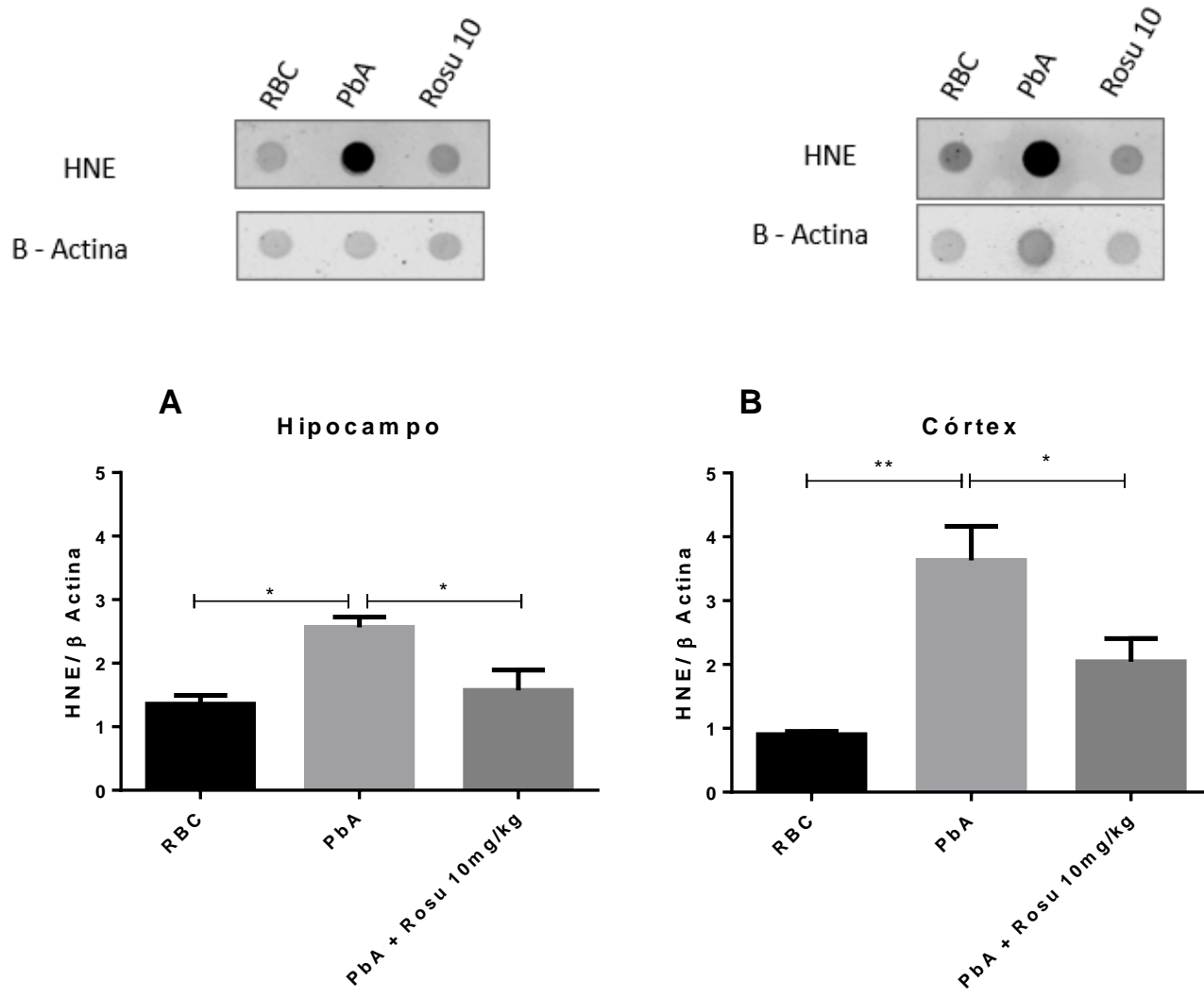


Figura 8. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão da proteína hidroxinonenal (HNE) foi avaliada por Dot blot no hipocampo (7A) e no córtex (7B). *p<0,05 teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

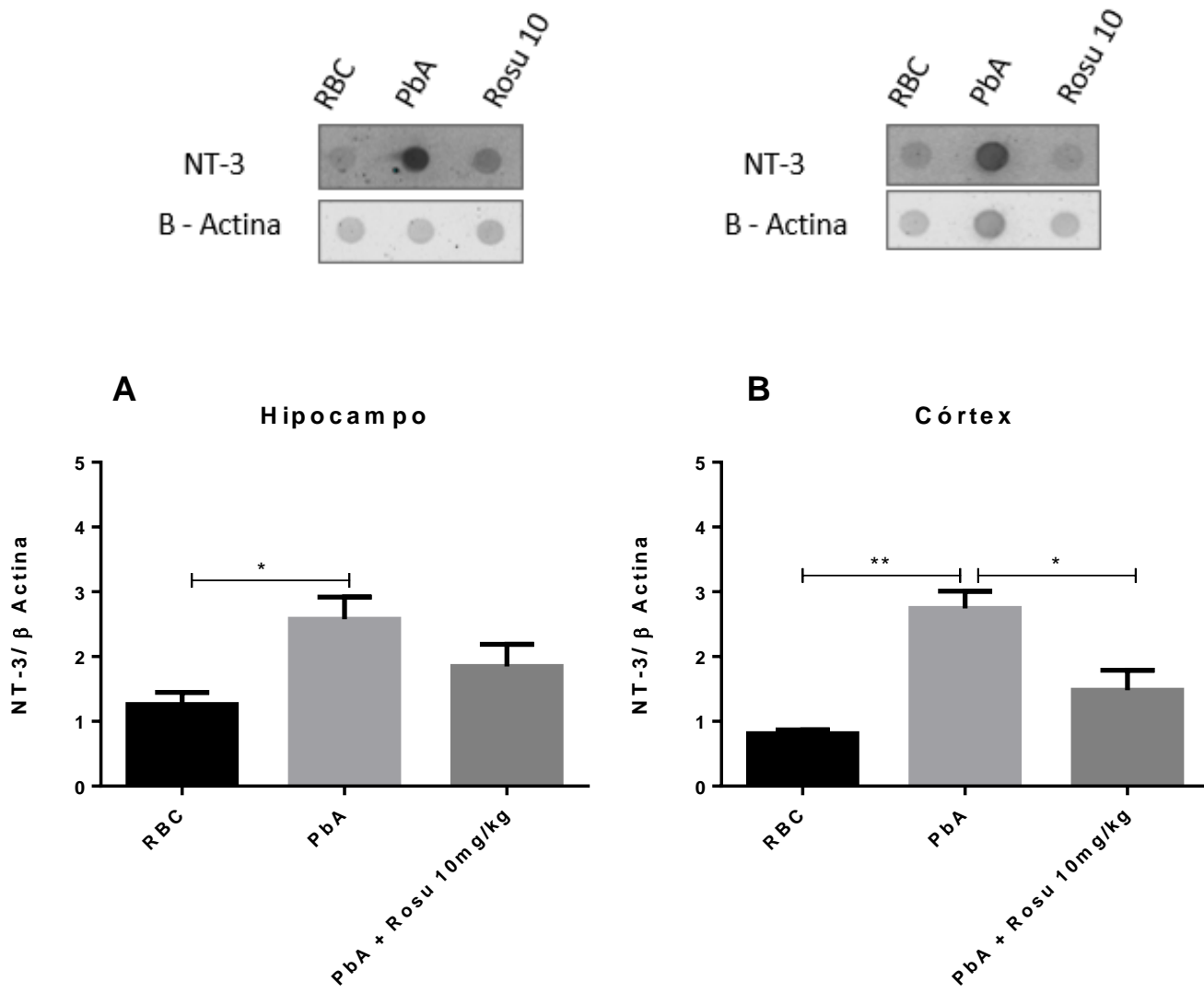


Figura 9. Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão da proteína 3-Nitrotirosina (NT-3) foi avaliada por Dot blot no hipocampo (8A) e no córtex (8B). *p<0,05 e **p<0,01 teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

7. Rosuvastatina diminui os níveis de pRac 1 no hipocampo de animais com MC

De modo a corroborar com os achados quanto à geração de estresse oxidativo, ainda no 6º dia pós infecção a marcação para a proteína GTPase Rac 1 foi avaliada na estrutura cerebral hipocampo dos animais através da técnica de Western Blotting. Para esse procedimento, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

A expressão da GTPase Rac 1 foi avaliada tanto na sua forma total quanto na sua forma ativada fosforilada pRac1. Essa proteína desempenha um papel crucial com relação à geração de ROS, uma vez que contribui para a ativação e montagem da enzima NADPH oxidase (WASSMANN *et al.*, 2001).

Como demonstrado pela **Figura 10A**, a expressão da proteína em sua forma total não é diferente entre os grupos de animais, apontando que a infecção com PbA ou o tratamento com rosuvastatina não foram capazes de alterar o perfil total dessa proteína. Porém, a forma ativada, ou seja, fosforilada da GTPase Rac 1 foi avaliada. Como demonstrado pela **Figura 10B**, os animais PbA apresentam uma maior expressão de Rac 1 fosforilada, com uma densitometria média de 0,7 entre os animais do grupo, significativamente diferente em comparação com os animais tratados com rosuvastatina, os quais apresentam uma densitometria média de 0,4. Desse modo, a infecção por PbA pode contribuir para a indução de uma maior atividade da enzima NADPH oxidase através de vias relacionadas à GTPase Rac 1.

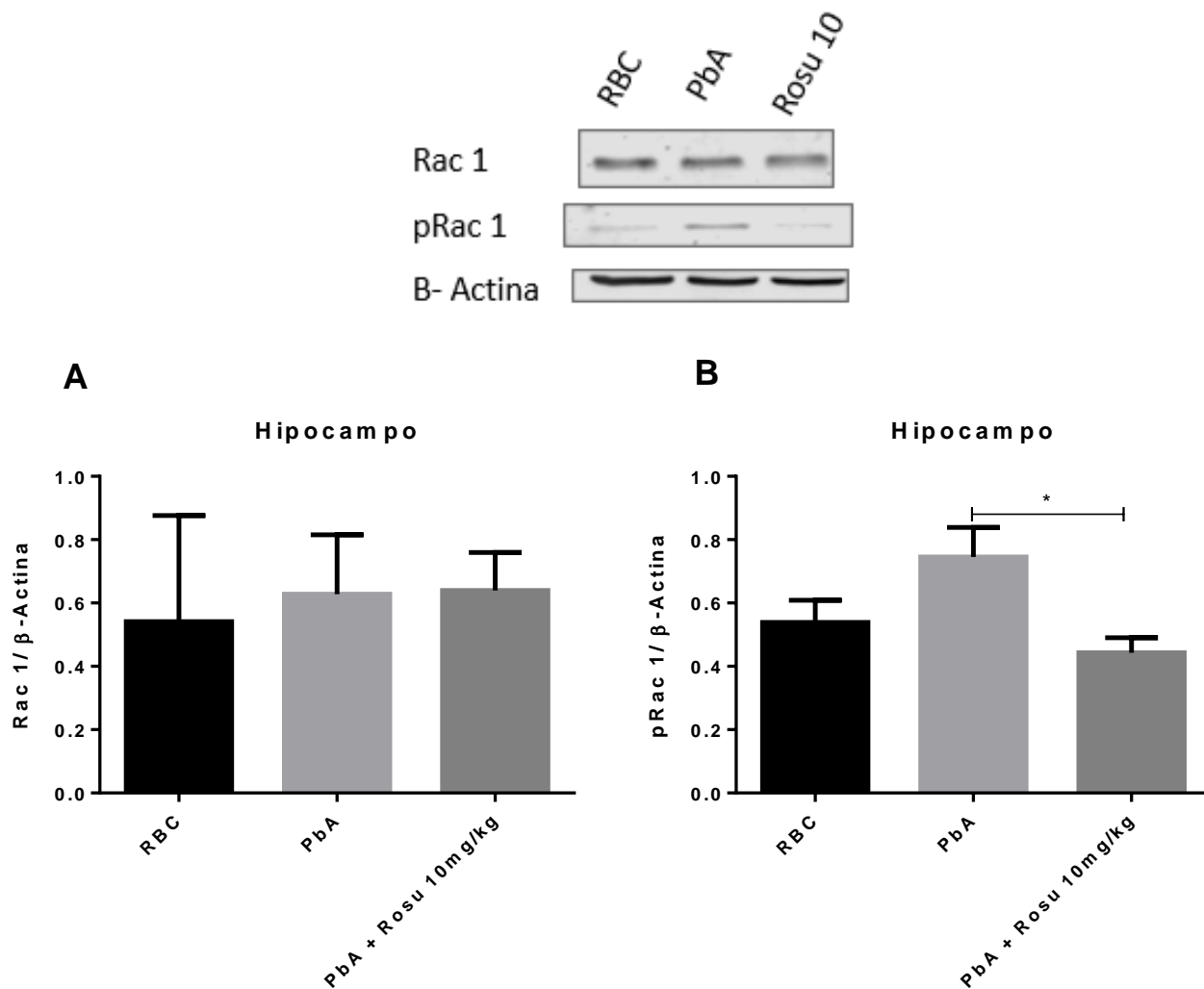


Figura 10. Avaliação da expressão da GTPase Rac1 em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6^o dia pós infecção, quando a expressão da proteína Rac 1 em sua forma total (9A) e na sua forma ativada (9B) foi avaliada por Western blotting no hipocampo. * $p < 0,05$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 2 experimentos).

8. Rosuvastatina diminui a expressão de nNOS no cérebro de animais infectados com PbA

Sabe-se que o NO tem um papel controverso na patogênese da MC. Ainda que em condições fisiológicas normais NO esteja relacionado com a regulação do tônus vascular, em condições patológicas, RNS que derivam do NO podem contribuir para o aumento da injúria tecidual, sobretudo quando combinado com ROS (BLOODSWORTH; DONNELL; FREEMAN, 2000; GAUT *et al.*, 2002). (GAUT *et al.*, 2002; ISCHIROPOULOS, 1998). A isoforma neuronal de NOS, comumente expressa em células endoteliais, neurônios e astrócitos, desempenha papel importante na neurodegeneração em casos de isquemia seguida de reperfusão (SAVOIA *et al.*, 2011).

Sendo assim, ainda no 6º dia pós infecção, a marcação para nNOS foi avaliada na estrutura cerebral total dos animais através da técnica de Western Blotting. Para esse procedimento, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

Como demonstrado pela **Figura 11**, a expressão de nNOS não é diferente entre os grupos de animais PbA e RBC. Porém, os animais PbA apresentam uma maior expressão de nNOS, com uma densitometria média de 0,5 entre os animais do grupo, significativamente maior em comparação com os animais tratados com rosuvastatina, os quais apresentam uma densitometria média de 0,2.

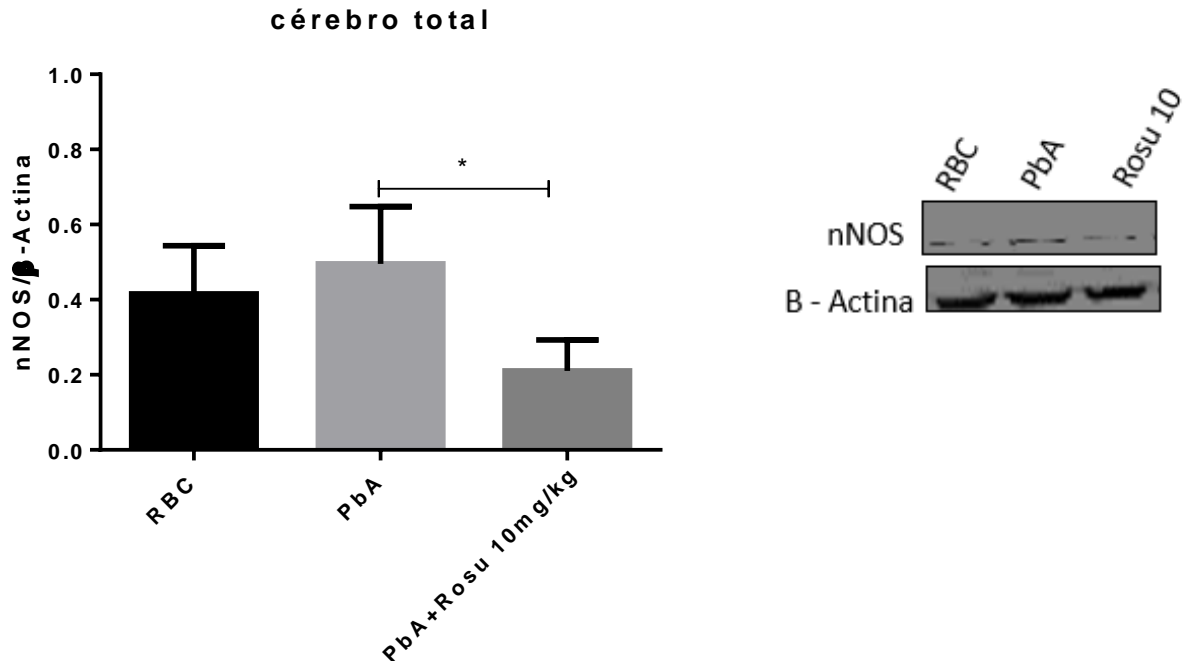


Figura 11. Avaliação da expressão de nNOS em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão da proteína nNOS foi avaliada por Western blotting no tecido cerebral total. * $p < 0,05$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

9. Rosuvastatina tem efeito neuroprotetor no modelo de MC experimental

As células neuronais são muito frágeis em relação ao dano causado por radicais livres (HUNT; GRAU, 2006). Assim, a vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo é manifestada, entre outros aspectos, pela deterioração das habilidades motoras e cognitivas, ou seja, a neurodegeneração (BIESALSKI, 2002). A MC exerce influência na habilidade de cognição do cérebro, afetando vias que são essenciais para processos de aprendizagem e memorização (VIANNA, M R *et al.*, 2000).

Sendo assim, ainda no 6º dia pós infecção, a proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1/2 (Erk 1/2) que está amplamente envolvida na regulação de funções neuronais em indivíduos saudáveis ou acometidos por condições neurodegenerativas (AMATO; PERRONE-CAPANO; PORZIO, 2003) foi avaliada.

A marcação para a proteína ERK1/2 foi avaliada na estrutura cerebral hipocampo dos animais através da técnica de Western Blotting. Para esse procedimento, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

A expressão dessa quinase foi avaliada em sua forma fosforilada, ou seja, ativada. Como demonstrado pela **Figura 12**, os animais PbA apresentaram maior expressão das proteínas quinases ERK 1/2, quando comparados com os animais RBC. Desse modo, a neurodegeneração é ocasionada pela infecção por PbA. Foi visto que os animais PbA apresentam uma maior expressão de ERK 1/2 fosforilada, com uma densitometria média de 5 entre os animais do grupo, significativamente diferente em comparação com os animais tratados com rosuvastatina, os quais apresentam uma densitometria média de 2,5, demonstrando que o tratamento com rosuvastatina foi capaz de reverter a expressão de ERK 1/2 pela metade.

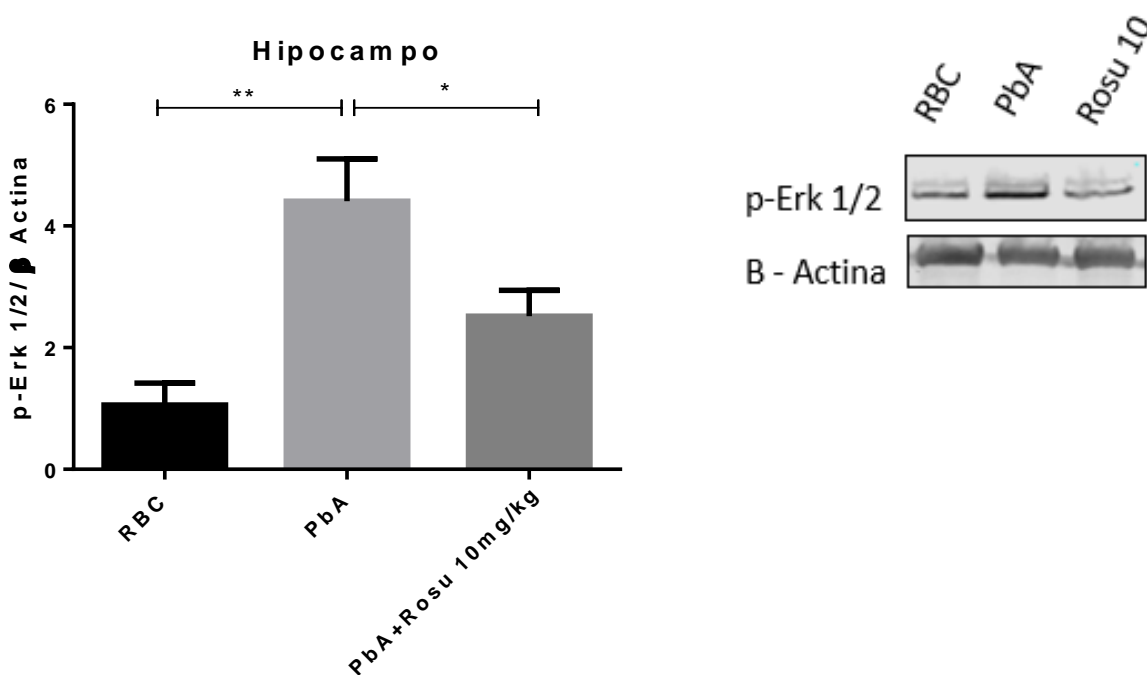


Figura 12. Avaliação da expressão de p-Erk 1/2 em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão da proteína fosforilada Erk 1/2 foi avaliada por Western blotting no tecido cerebral total. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

10. No hipocampo, rosuvastatina normaliza os níveis de proteínas pré e pós-sinápticas na MC

Frente a quadros de doenças de carácter neurodegenerativo há a perda de sinapses, bem como a redução dos marcadores sinápticos, o que está intimamente associado com o dano cognitivo gerado nessas patologias (YUKI *et al.*, 2014). O remodelamento da plasticidade sináptica é diretamente associado a processos que culminam na consolidação da memória. Sendo assim, tendo em vista o cenário de neurodegeneração causado a partir do quadro de MC, a avaliação das proteínas sinápticas foi realizada com o objetivo de investigar de que forma esse processo estaria afetando a plasticidade sináptica nos animais infectados e como o tratamento com rosuvastatina influenciaria.

Através da técnica de Western Blotting, foi realizada a marcação de PSD-95 e Sinaptofisina, proteínas pré e pós-sinápticas, respectivamente. Para isso, os animais infectados com PbA e RBC não receberam nenhum tipo de tratamento, salvo os animais do grupo PbA+Rosu que foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina a partir dos primeiros sinais da doença.

Como demonstrado na **Figura 13**, em um quadro de MC aguda, o hipocampo dos animais PbA apresentam maior expressão dessas proteínas significativamente diferente dos animais tratados com rosuvastatina. Na **Figura 13A**, é possível observar que a infecção com PbA aumentou a expressão de Sinaptofisina no hipocampo dos animais com relação aos animais RBC. Porém, a partir do tratamento com rosuvastatina, a expressão foi reduzida a níveis semelhantes ao dos animais RBC. Na **Figura 13B**, o tratamento com rosuvastatina reduziu significativamente a expressão de PSD-95.

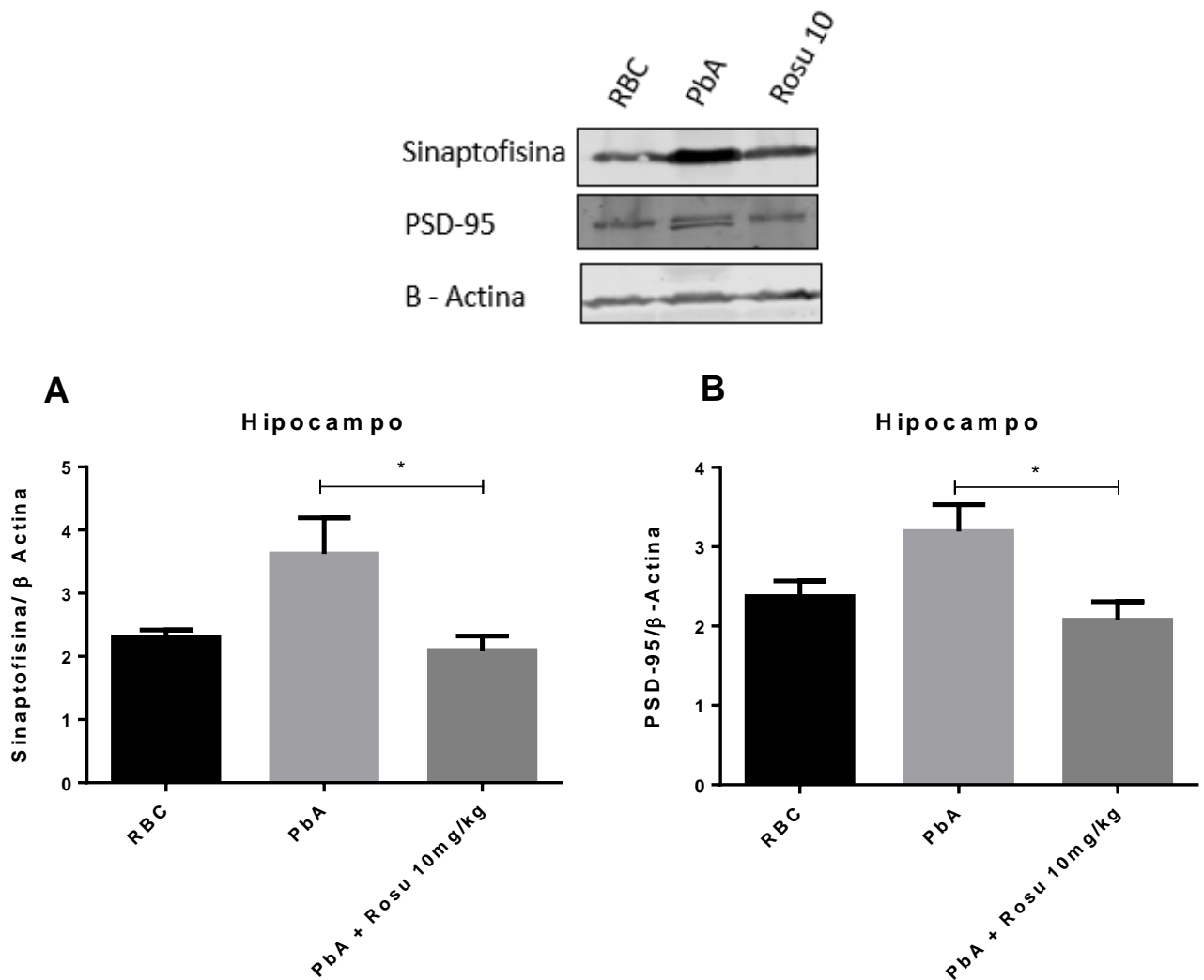


Figura 13. Avaliação da expressão das proteínas pré e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com salina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 6º dia pós infecção, quando a expressão das proteínas pré-sináptica sinaptofisina (11A) e pós-sináptica PSD-95 (11B) foram avaliadas por Western blotting no hipocampo. * $p < 0,05$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 3 experimentos).

11. A terapia combinada do antimalárico com rosuvastatina evita o comprometimento da cognição dos animais com MC

As injúrias causadas no cérebro pelas reações inflamatórias inerentes da fisiopatologia da MC resultam em sequelas cognitivas. A administração de antimaláricos durante o curso da doença não contribui para que as sequelas cognitivas sejam evitadas nem tão pouco amenizadas (BANGIRANA *et al.*, 2011; CARTER *et al.*, 2005), muitas vezes se desenvolvendo em longo prazo e com caráter permanente (HIGGINS; KAIN; LILES, 2011). Desse modo, testes comportamentais que avaliam a capacidade cognitiva foram realizados nos animais após a recuperação do quadro de MC.

Para esse procedimento, um novo grupo de animais foi dividido nos grupos experimentais de PbA, o controle infectado; PbA+Rosu, animais infectados e tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina; RBC, o controle não infectado; e RBC+Rosu, o controle infectado tratado com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina. Todos os animais, infectados ou não, foram tratados também com o antimalárico cloroquina, de modo a preservá-los a sobrevivência. Os tratamentos, seja com o antimalárico ou rosuvastatina, iniciaram-se a partir dos primeiros sinais da doença e perduraram 7 dias. Os testes foram realizados no 15º dia pós infecção. Ao final dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e o seu tecido cerebral coletado para análise.

A partir do teste comportamental de congelamento condicionado, também conhecido como *freezing*, é possível avaliar a memória aversiva e contextual desses animais. A **Figura 14** demonstra que a latência apresentada no dia do teste dos animais RBC é significativamente superior à latência apresentada pelos animais PbA tratados somente com o antimalárico cloroquina, sugerindo que a doença acarreta de fato na disfunção cognitiva. Por outro lado, o tratamento com rosuvastatina é suficiente para a reversão e/ou prevenção dessa disfunção, uma vez que o tempo de latência é significativamente superior nos animais PbA tratados com rosuvastatina quando comparado com os animais PbA.

A **Figura 15A** demonstra a curva de aprendizado dos animais pelo teste cognitivo Labirinto aquático de Morris (*Water maze*). É observado que os animais submetidos à infecção com PbA têm um comprometimento da sua capacidade de aprendizado. No entanto, animais PbA tratados com rosuvastatina têm desempenho similar aos animais RBC e não apresentam a perda dessa capacidade, sugerindo que o tratamento com

rosuvastatina confere proteção quanto às funções cognitivas durante a infecção. Já a **Figura 15B** exibe o que foi observado no quarto dia de experimento com os animais, relacionando o tempo de chegada dos mesmos até a plataforma. É possível observar que, comparativamente, os animais PbA levam significativamente mais tempo do que os demais grupos para alcançar a devida plataforma.

A **Figura 15C**, portanto, demonstra quanto tempo os animais permanecem nadando em torno do local da plataforma depois que a mesma é retirada. É esperado que os animais saudáveis e que se recordam da localização, permaneçam pairando em torno do local em que a plataforma estava. Assim sendo, é possível observar que a permanência no local da plataforma apresentada no quinto dia do teste dos animais PbA é significativamente inferior à apresentada pelos animais RBC e PbA tratados com rosuvastatina, sugerindo que a doença acarreta de fato na disfunção cognitiva e que o tratamento com rosuvastatina é suficiente para a reversão e/ou prevenção dessa disfunção.

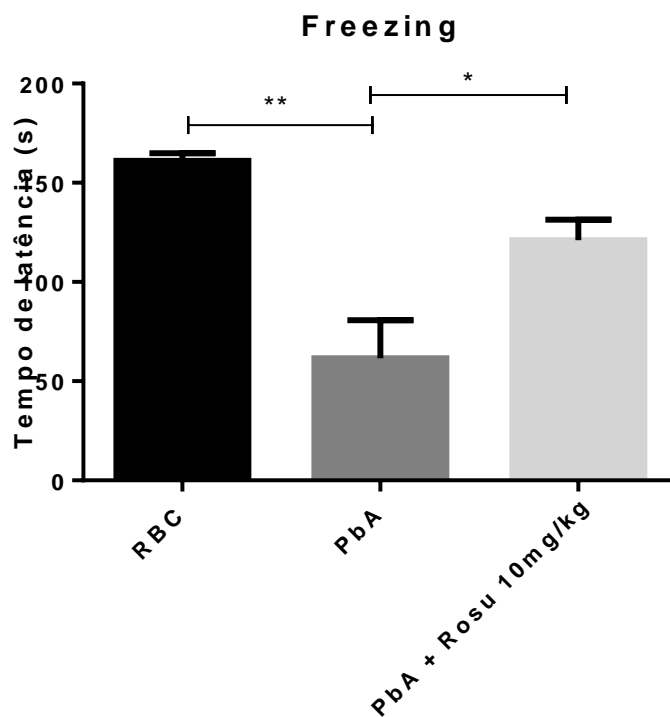


Figura 14. Avaliação da memória aversiva de camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com o antimalárico cloroquina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 11º dia pós infecção, totalizando 7 dias de tratamento, quando a memória aversiva foi avaliada através do teste comportamental de congelamento condicionado (*Freezing*) após o 15º dia de infecção com PbA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

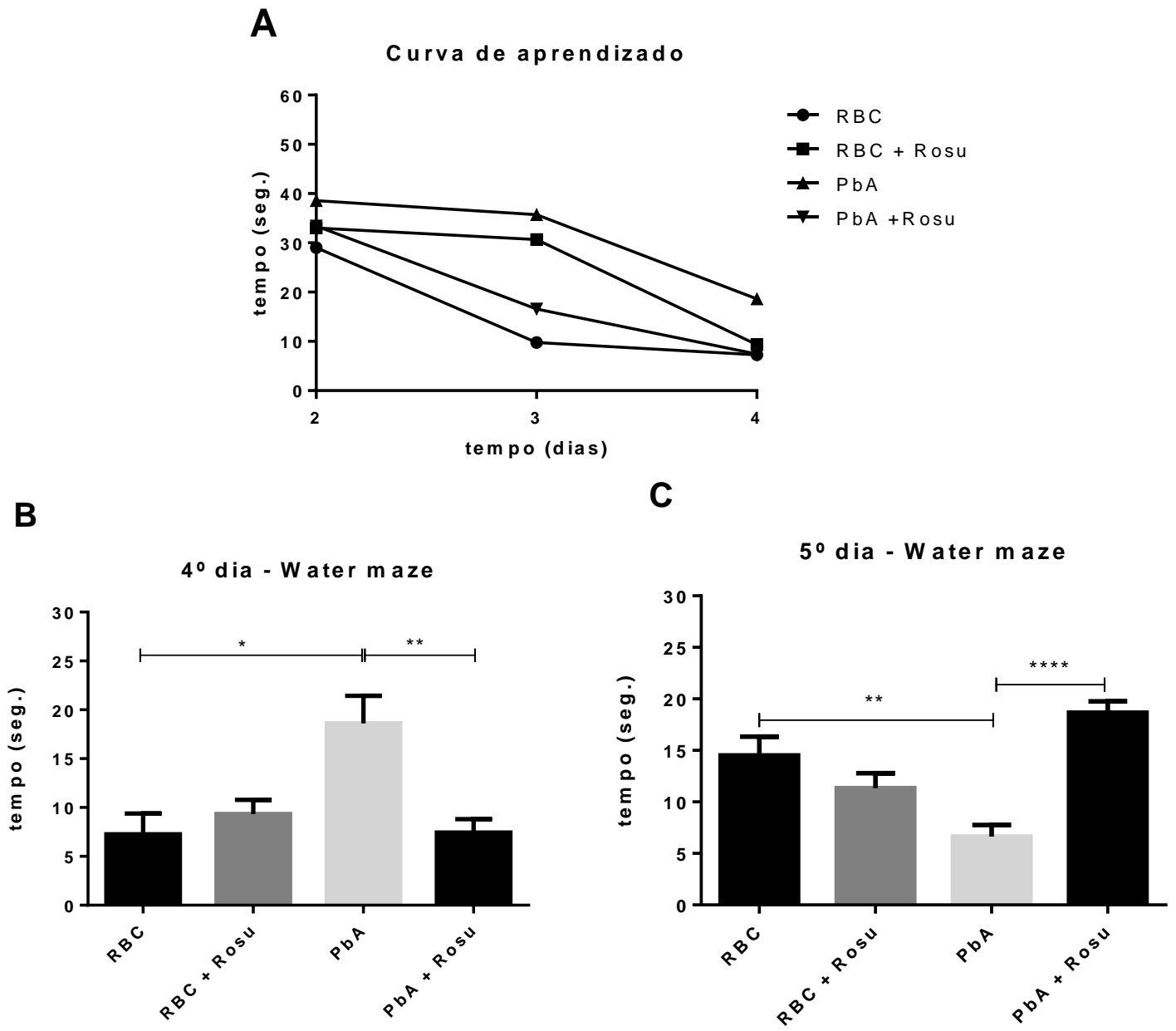


Figura 15. Avaliação da memória espacial de camundongos C57BL/6 não infectados não tratados (RBC) e tratados (RBC+Rosu 10 mg/kg); infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com o antimalárico cloroquina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave, não infectados tratados com salina (RBC) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (RBC+Rosu). O tratamento perdurou até o 11º dia pós infecção, totalizando 7 dias de tratamento, quando a memória espacial foi avaliada através do teste comportamental labirinto aquático de Morris (*Water maze*) após o 15º dia de infecção com PbA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pelo teste Anova, post hoc Tukey. (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

12. 15 dias após a infecção com PbA os níveis das proteínas pré e pós-sinápticas retornam a seu estado basal no cérebro dos animais

Em um contexto de MC já resolvida, foram avaliadas a expressão das proteínas sinápticas PSD-95 e Sinaptofisina na estrutura cerebral hipocampo dos animais a partir da técnica de Western Blotting. Para esse procedimento, os animais do grupo PbA+Rosu foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina e, assim como os animais infectados com PbA e RBC, foram tratados adicionalmente com o antimalárico cloroquina. Os tratamentos, seja com o antimalárico ou rosuvastatina, iniciaram-se a partir dos primeiros sinais da doença e perduraram 7 dias.

A **Figura 16** demonstra a expressão de ambas proteínas após 15 dias de infecção. Diferentemente do observado a partir dos dados que relaciona a avaliação dessas mesmas proteínas sinápticas em um quadro de MC aguda, ou seja, no 6º dia pós infecção, no atual cenário de MC resolvida o hipocampo dos animais PbA não apresenta maior expressão dessas proteínas significativamente diferente dos animais tratados com rosuvastatina ou com relação aos animais RBC. Na **Figura 16A**, é possível observar que a média de densitometria para Sinaptofisina dentre os animais dos grupos RBC, PbA e PbA tratados com rosuvastatina são de, em média, 0,02.

Já na **Figura 16B**, é possível observar que a densitometria média entre todos os grupos para a expressão de PSD-95 é de 0,3. Ambas as proteínas sinápticas apresentaram densitometria média muito similares, indicando que a condição fisiológica pós patologia pode ter sido restaurada no aspecto sináptico, ainda que o dano cognitivo tenha sido observado na realização dos testes comportamentais.

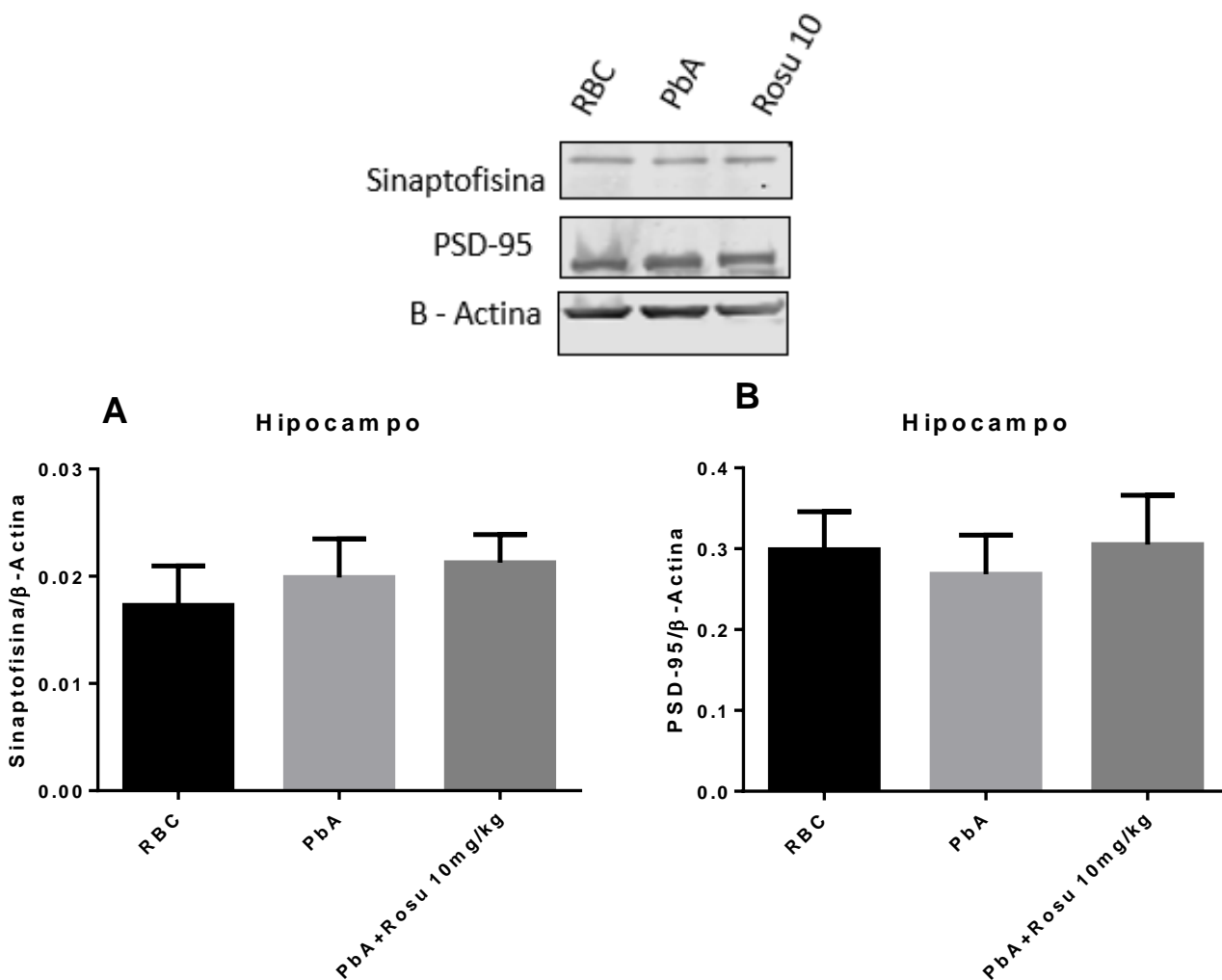


Figura 16. Avaliação da expressão das proteínas pré e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com o antimalárico cloroquina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave. O tratamento perdurou até o 11º dia pós infecção, totalizando 7 dias de tratamento, quando a expressão das proteínas pré-sináptica sinaptofisina (14A) e pós-sináptica PSD-95 (14B) foram avaliadas por Western blotting após o 15º dia de infecção com PbA no hipocampo. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste Anova, post hoc Tukey). (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

13. *Animais infectados e tratados com antimalárico e rosuvastatina exibem níveis basais de Rac 1 após 15 dias*

Também no contexto de MC já resolvida, foi avaliada a expressão da proteína GTPase Rac 1 na estrutura cerebral hipocampo dos animais a partir da técnica de Western Blotting. Para esse procedimento, os animais do grupo PbA+Rosu foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina e, assim como os animais infectados com PbA e RBC, foram tratados adicionalmente com o antimalárico cloroquina. Os tratamentos, seja com o antimalárico ou rosuvastatina, iniciaram-se a partir dos primeiros sinais da doença e perduraram 7 dias.

A expressão da GTPase Rac 1 foi avaliada na sua forma total quanto na sua forma ativada fosforilada pRac1. Como demonstrado pela **Figura 17A**, a expressão da proteína em sua forma total não é diferente entre os grupos de animais, apontando que a infecção com PbA ou o tratamento com rosuvastatina e cloroquina não foram capazes de alterar o perfil total dessa proteína. Ambos os grupos apresentaram densitometria média muito similares.

Como demonstrado pela **Figura 17B**, diferentemente do observado a partir dos dados que relaciona a avaliação dessa proteína em um quadro de MC aguda os animais PbA não apresentaram uma maior expressão de pRac 1 com relação aos animais RBC. É possível observar que a média de densitometria para pRac 1 dentre os animais dos grupos RBC, RBC tratados com rosuvastatina, PbA e PbA tratados com rosuvastatina são de, em média, 0,2.

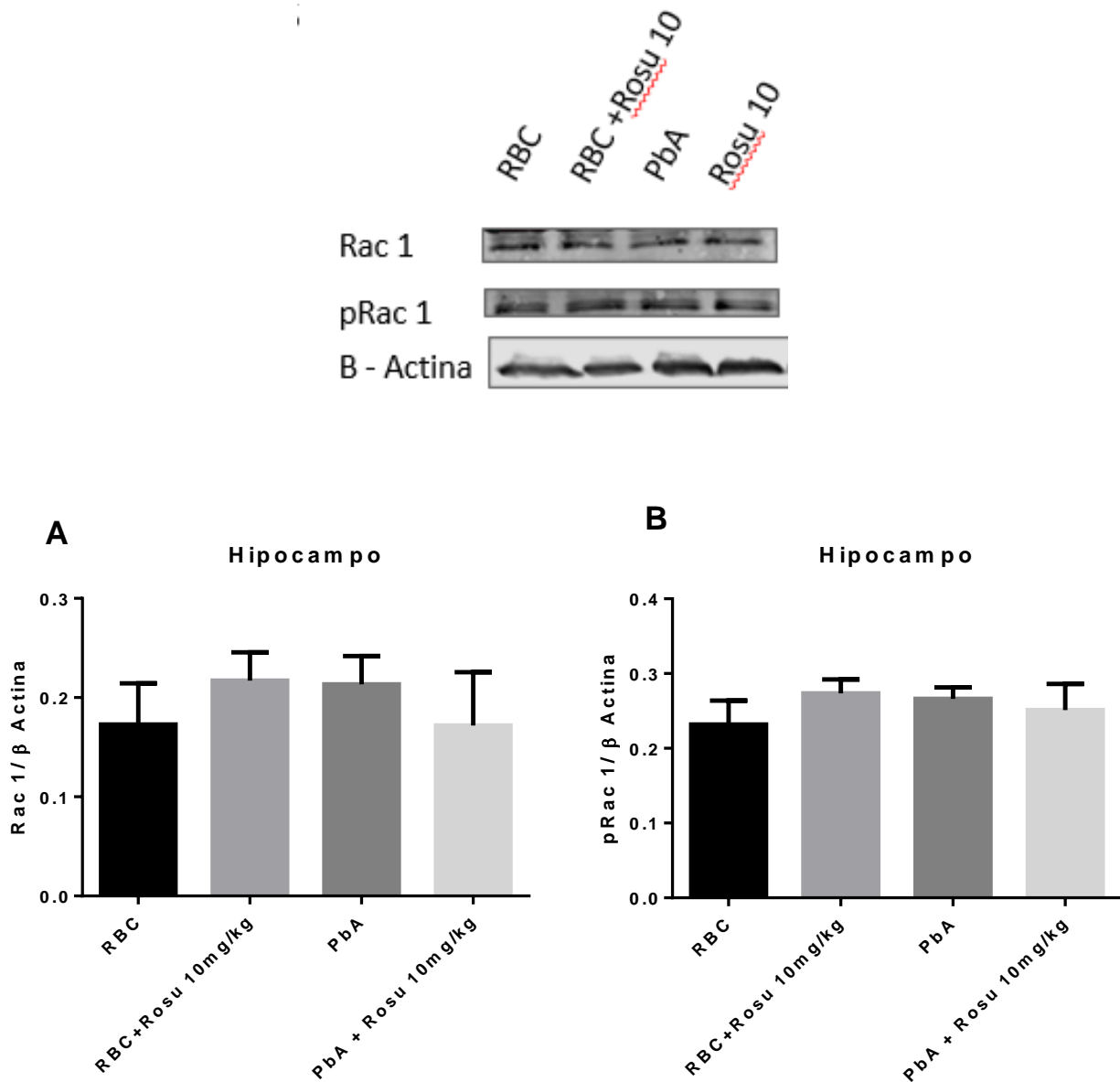


Figura 17. Avaliação da expressão das proteínas pré e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com o antimalárico cloroquina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave, não infectados tratados com salina (RBC) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (RBC+Rosu). O tratamento perdurou até o 11º dia pós infecção, totalizando 7 dias de tratamento, quando a expressão das proteínas pré-sináptica sinaptofisina (14A) e pós-sináptica PSD-95 (14B) foram avaliadas por Western blotting após o 15º dia de infecção com PbA no hipocampo. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste Anova, post hoc Tukey). (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

14. *Animais infectados e tratados com antimalárico e rosuvastatina exibem níveis aumentados de BDNF após 15 dias*

A fim de que disfunção neuronal possa ser melhor elucidada, também foi avaliada, através da técnica de Western Blotting, a expressão do fator neurotrófico BDNF. Essa proteína está envolvida na sobrevivência neuronal, sendo essencial para o processo de formação e consolidação da memória de longo prazo, bem como para a plasticidade e função sináptica (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013).

Para esse procedimento, os animais do grupo PbA+Rosu foram tratados com a dose de 10 mg/kg de rosuvastatina e, assim como os animais infectados com PbA e RBC, foram tratados adicionalmente com o antimalárico cloroquina. Os tratamentos, seja com o antimalárico ou rosuvastatina, iniciaram-se a partir dos primeiros sinais da doença e perduraram 7 dias.

Após 15 dias, os níveis de BDNF foram avaliados, tanto em sua forma imatura como na sua forma madura, aqui representados nas **Figuras 18A** e **18B** como pró-BDNF e BDNF, respectivamente. É possível observar que os animais RBC, os animais PbA e os animais PbA tratados com rosuvastatina não exibem distinção significativa dos níveis de pró-BDNF. Contudo, com relação ao BDNF maduro, os animais PbA exibem níveis inferiores quando comparados aos animais PbA tratados com rosuvastatina e os animais RBC tratados com rosuvastatina.

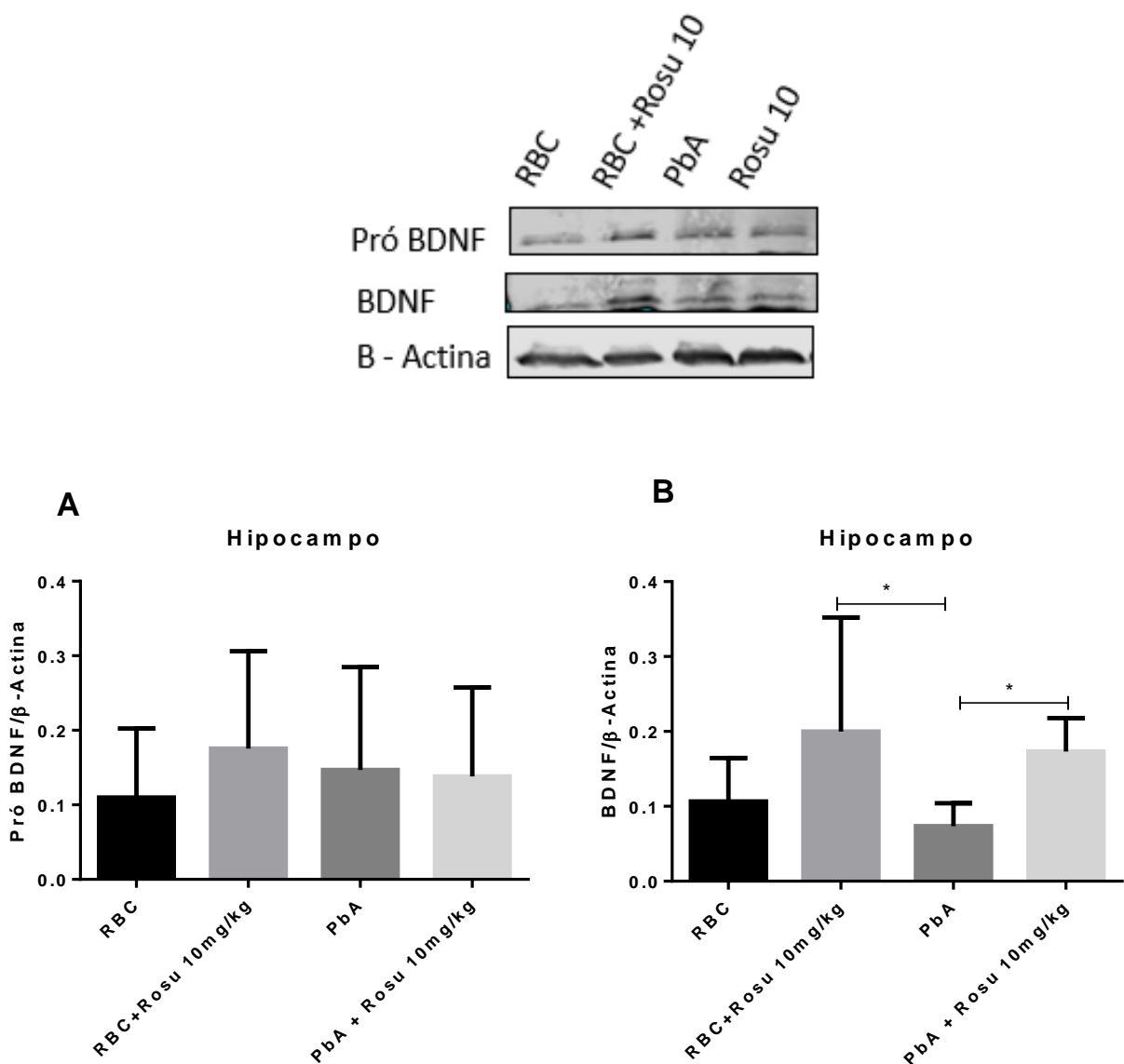


Figura 18. Avaliação da expressão das proteínas pré e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 não infectados (RBC), infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) não tratados e tratados com rosuvastatina (PbA+Rosu 10 mg/kg). Camundongos machos C57BL/6 foram infectados com PbA e tratados com o antimalárico cloroquina (PbA) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (PbA+Rosu 10 mg/kg) a partir dos primeiros sinais de malária grave, não infectados tratados com salina (RBC) ou tratados com rosuvastatina a 10 mg/kg v.i. em conjunto com cloroquina (RBC+Rosu). O tratamento perdurou até o 11º dia pós infecção, totalizando 7 dias de tratamento, quando a expressão das proteínas pré-sináptica sinaptofisina (14A) e pós-sináptica PSD-95 (14B) foram avaliadas por Western blotting após o 15º dia de infecção com PbA no hipocampo. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste Anova, post hoc Tukey). (n= 5-10 animais/grupo; repetição de 1 experimento).

Discussão

A malária é uma infecção parasitária de importância e abrangência mundial. A morbidade, severidade e mortalidade da malária afeta, principalmente crianças menores de 5 anos. O quadro de MC é uma das piores complicações diante da malária falcípara e estima-se que, a cada ano, principalmente na região da África Subsaariana, mais de 570 mil crianças são acometidas e cerca de 20% vão a óbito (MILNER, 2018; WHO, 2019). Danos cerebrais desencadeados por reações inflamatórias decorrentes dessa infecção são os principais agravantes dessa doença que acometem o SNC, resultando em sequelas cognitivas que, em grande parte dos casos, acarretam ao óbito (BANGIRANA *et al.*, 2011; CARTER *et al.*, 2005; FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010). Diversos estudos clínicos envolvendo crianças demonstram que apesar da administração de antimaláricos durante o curso da MC as sequelas cognitivas não são evitadas nem tão pouco amenizadas (BANGIRANA *et al.*, 2011; CARTER *et al.*, 2005). Essas injúrias cerebrais muitas vezes se desenvolvem em longo prazo e possuem caráter permanente (HIGGINS; KAIN; LILES, 2011).

Apesar de comumente associadas ao tratamento de doenças cardiovasculares e dislipidemias, as estatinas têm despertado cada vez mais interesse no meio científico com relação aos seus efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas e neurológicas, como Alzheimer e Parkinson (AHN; CHOI, 2015). Dentre seus efeitos pleiotrópicos, a modulação da neuroinflamação e da ativação de células da glia, processos estes que acarretam no dano e comprometimento neuronal (BARONE *et al.*, 2012; BIENVENU, ANNE-LISE; PICOT, 2008; SOURAUD *et al.*, 2012; TORRENTINO-MADAMET *et al.*, 2009), além da melhora da perfusão sanguínea cerebral são notáveis (NICKENIG *et al.*, 2002, REIS *et al.*, 2012). Em um estudo realizado por nosso grupo em 2012, a partir da indução do quadro de MC experimental murina, o tratamento com estatinas em conjunto com o antimalárico cloroquina foi capaz de prevenir o desenvolvimento da sequela cognitiva (REIS *et al.*, 2012). Porém, os mecanismos celulares e moleculares que originaram essa proteção ainda não estão bem esclarecidos. Sendo assim, o presente estudo almejou, a partir do uso da rosuvastatina, além da prevenção da inflamação, neurodegeneração e comprometimento cognitivo frente à MC, melhor elucidação dos mecanismos que os geram.

A partir dos resultados gerados nesse trabalho, é possível notar que o tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina foi capaz de atenuar os sintomas da malária grave. Entretanto, não teve efeito algum com relação ao estabelecimento da infecção, uma vez que não apresentou efeito contra o desenvolvimento da parasitemia, quaisquer que tenham sido as concentrações administradas. Esses achados corroboram estudos que demonstram que a partir do tratamento com diferentes concentrações de estatinas (20 a 400 mg/kg), animais infectados com PbA ainda que não apresentem redução nos níveis de parasitemia, apresentam melhora no quadro infeccioso (BIENVENU, ANNE-LISE; PICOT, 2008; KOBBE; SCHREIBER; JACOBS, 2008; SOURAUD *et al.*, 2012).

Nesse estudo, a permeabilidade vascular e consequente quebra da BHE foi avaliada a partir do ensaio de Azul de Evans. A partir da injeção de corante que possui afinidade com a albumina circulante (HUNT *et al.*, 2014), o cérebro dos animais infectados tratados e não tratados se tornam suscetíveis à análise quanto ao extravasamento do mesmo para o parênquima cerebral. Foi possível verificar um aumento significativo da permeabilidade vascular nos animais infectados com PbA no momento em que desenvolveram o quadro de MC, apontando para a contribuição efetiva do evento para o estabelecimento da patologia degenerativa. A mudança na função da BHE, mais especificamente sua permeabilização, é característica da MC tanto observada em humanos como experimentalmente (BROWN *et al.*, 2001; POH; HOWLAND; GROTENBREG, 2014). A terapia com estatinas já se demonstrou protetora na preservação da integridade da BHE (REIS *et al.*, 2012). Além disso, estudos demonstram a preservação da BHE através da inibição da GTPase Rho (STAMATOVIC *et al.*, 2003; TAOUFIQ *et al.*, 2008). Sabendo que um dos mecanismos de ação das estatinas é a inibição da isoprenilação das GTPases, é uma perspectiva do atual estudo a avaliação da atividade de Rho no que concerne à preservação da BHE frente à infecção por MC de forma a corroborar com os dados obtidos até então.

O quadro de MC é caracterizada principalmente pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias próprias do fenótipo celular Th1, dentre elas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 (DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017; HUNT; GRAU, 2006). Tais citocinas são críticas para o controle da infecção por *P. falciparum* no que diz respeito ao seu ciclo exoeritrocítico e eritrocítico. Porém, a alta produção e secreção das mesmas está relacionada à injúrias teciduais, sobretudo do cérebro (HUNT *et al.*, 2014; HUNT; GRAU,

2006). Assim como esperado, no presente trabalho, os animais infectados com PbA e que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, apresentaram aumento significativo dos níveis teciduais e séricos das citocinas TNF- α e IFN- γ . Contudo, o tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis séricos de TNF- α e os níveis séricos e também teciduais de IFN- γ frente à infecção, desempenhando assim um papel anti-inflamatório da mesma forma como visto por Reis e colaboradores (2012), em que o tratamento com lovastatina foi responsável por reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-12. Outros estudos sugerem o mesmo efeito a partir do tratamento com outros fármacos da classe das estatinas (HERNÁNDEZ-ROMERO *et al.*, 2008; HIRAOKA *et al.*, 2004; STÜVE *et al.*, 2003).

Por conta dos altos níveis séricos de TNF- α nos casos de MC, há conseqüentemente uma alta expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular cerebral, o que favorece a piora do quadro através do sequestro celular (HUNT; GRAU, 2006). Diferentemente do que é observado no quadro de MC em humanos, os tipos celulares que são comumente sequestrados no endotélio capilar cerebral de camundongos acometidos com MC não são somente hemácias parasitadas, mas também leucócitos (CARVALHO, 2011; QUE *et al.*, 2005). Diversos estudos apontam o impacto dos neutrófilos, que são a população de leucócitos mais abundantes da circulação, no desenvolvimento da MC (FEINTUCH *et al.*, 2016). Quando ativados, principalmente por grandes quantidades de IFN- γ , são responsáveis por secretar proteases e mieloperoxidase (MPO), uma hemeoproteína presente nos grânulos dos fagócitos, as quais contribuem diretamente não só para a resposta contra o parasita, como também geram o dano tecidual (OTTERDAL *et al.*, 2018). Além da produção por células imune presentes na circulação periférica, a produção de MPO também é verificada por células nervosas, como neurônios, células da microglia e astrócitos previamente ativados (RAY; KATYAL, 2016). No presente estudo, podemos observar que rosuvastatina foi capaz de reduzir os níveis de MPO no cérebro dos animais infectados.

O comprometimento da integridade da BHE e a neurodegeneração afeta diretamente a dinâmica celular cerebral, como por exemplo, a distribuição e propriedades de astrócitos e microglia, células componentes do parênquima cerebral (HUNT; GRAU, 2006). A microglia se caracteriza como as células imunes inatas do sistema nervoso central (SNC). Frente à estímulos, esta adquire um fenótipo ameboide, que caracteriza

tipicamente o seu estado imunologicamente ativado (ISABELLE M. MEDANA, 1997). Os astrócitos, população de célula glial do SNC que majoritariamente oferece suporte ao tecido nervoso (SOFRONIEW; VINTERS, 2010), são responsáveis por responder aos insultos teciduais através do mecanismo de astrogliose, o qual tem sido observado em doenças neurodegenerativas (GLASS *et al.*, 2010). Estudos demonstram que indivíduos acometidos com MC apresentam intensa astrogliose, degeneração de astrócitos e ativação da microglia (HUNT, 2001). No presente estudo, animais infectados com PbA que não foram submetidos a tratamento algum exibiram maior expressão das proteínas Iba-1, marcador para microglia, e GFAP, marcador para astrogliose, 6 dias depois da infecção. A ativação dessas células foi revertida a partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina, o que corrobora dados da literatura (FEHER *et al.*, 2015; PH *et al.*, 2010; ZAMVIL; STEINMAN, 2002). A astrogliose também pôde ser observada a partir dos altos níveis de S100 β no tecido cerebral de animais infectados com PbA. S100 β é uma proteína ligante de cálcio que está presente no citoplasma de astrócitos perivasculares (THELIN *et al.*, 2016). Esse quadro também foi revertido a partir do tratamento com rosuvastatina.

Ativação de células da glia e ativação de enzimas são frequentemente associadas com a neurotoxicidade a partir do estresse oxidativo (GLASS *et al.*, 2010). No presente estudo, o estresse oxidativo foi verificado a partir da avaliação dos subprodutos da peroxidação lipídica, da nitrosilação de proteínas e da atividade da enzima nNOS. A partir da análise de soro e também de tecido cerebral dos animais infectados com PbA, é notável a geração em excesso de lipoperoxidação a partir de grandes quantidades verificadas de HNE. Esse achado corrobora observações feitas de casos clínicos de MC, onde as hemácias se caracterizam por apresentar aumento dos produtos da peroxidação lipídica e decréscimo das defesas antioxidantes (AGUILAR *et al.*, 2014). Porém, a administração de rosuvastatina foi capaz de reverter o estresse oxidativo que acarretou na peroxidação lipídica gerados no cérebro dos animais infectados com PbA. Semelhantemente, estudos demonstram a habilidade das estatinas na inibição dos produtos derivados da oxidação do colesterol (BARONE *et al.*, 2012).

nNOS é a isoforma da enzima NOS que é expressa constitutivamente no cérebro, onde desempenha funções essenciais, como a sinalização sináptica (MUÑOZ; PUEBLA; FIGUEROA, 2015). Além disso, frente às condições patológicas, desempenha papel

importante na geração de estresse oxidativo. A partir da reação de oxidação de L-arginina para L-citrulina, sintetiza endogenamente o agente transdutor de sinal e também radical livre óxido nítrico (NO) que pode se combinar com ânions superóxido para então gerar peroxinitrito (ONOO⁻), o qual agrava ainda mais a injúria neuronal e tecidual da patologia (BLOODSWORTH; DONNELL; FREEMAN, 2000; GAUT *et al.*, 2002). Corroborando os achados na literatura, é notável que os animais infectados com PbA apresentam maior expressão de nNOS na região do hipocampo, podendo estar relacionado com a maior produção de NO pelas mesmas e, conseqüentemente, de nitrito. A própria MPO secretada pelas células da microglia ativada, astrócitos e neurônios prontamente reagem com o nitrito (NO₂⁻) causando a nitração de tirosina *in vivo* (BLOODSWORTH; DONNELL; FREEMAN, 2000). No presente estudo, observamos altos níveis de 3-Nitrotirosina (NT-3) no tecido cerebral de animais acometidos com MC experimental, o qual foi revertido por rosuvastatina. O aumento notado da nitração a partir de seu resíduo nos animais PbA com relação aos animais não infectados parece ser um mecanismo condizente com o aumento de MPO e de outras formas de geração de estresse que possam contribuir para danos celulares.

Além disso, sabe-se que a maior parte de ROS que é gerado na vasculatura provém do complexo proteico NADPH oxidase. Esse sistema enzimático é composto por inúmeras subunidades. Estudos apontam a GTPase Rac como sendo um elemento crucial para a sua ativação e montagem, garantindo a geração de ROS (WASSMANN *et al.*, 2001). Assim sendo, os altos níveis encontrados de pRac1 em animais infectados e não tratados quando comparados com animais não infectados condizem com o aumento da geração de estresse no tecido cerebral.

A perda de sinapses, bem como a redução dos marcadores sinápticos são associados com o dano cognitivo gerado em doenças de caráter neurodegenerativo, como a doença de Alzheimer, por exemplo (YUKI *et al.*, 2014). Aqui, focamos nas proteínas pré e pós-sinápticas sinaptofisina e PSD-95, respectivamente. É notável que, em um quadro de MC aguda, o hipocampo dos animais infectados não tratados apresentam maior expressão dessas proteínas. É notável também, que o tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina reduziu significativamente a expressão tanto de sinaptofisina quanto de PSD-95 quando comparado com os animais infectados não tratados.

Os receptores NMDA (NMDARs) são receptores ionotrópicos de glutamato, são expressos por todo o sistema nervoso e participam ativamente na regulação das transmissões sinápticas, bem como da plasticidade sináptica em si (COLLINGRIDGE; ISAAC; WANG, 2004). A partir da sua hiperativação, eles estão relacionados com o fenômeno da excitotoxicidade, que é vista em inúmeras condições que apresentam comprometimento neurológico, como Alzheimer, Parkinson, isquemia e injúria cerebral pós-traumática (BANO *et al.*, 2005; CARVAJAL; MATTISON; CERPA, 2016). Sendo assim, supusemos que os níveis aumentados das proteínas pré e pós-sinápticas frente ao quadro de MC poderiam estar relacionadas com o dano neuronal decorrente da toxicidade gerada pelo receptor, uma vez que é sabido que a proteína pós-sináptica PSD-95 é responsável por estabilizar a superfície e a expressão sináptica dos NMDARs (WON *et al.*, 2016). Além disso, estudos relatam o recrutamento de nNOS quando da ativação de NMDARs via PSD-95 (ISHII *et al.*, 2006; ZHOU, LI *et al.*, 2011). Portanto, os altos níveis de nNOS verificado no cérebro de animais infectados com PbA também podem ser mais um indicativo do fenômeno de excitotoxicidade nesse modelo de MC. Entretanto, sendo esse mecanismo responsável por gerar consequentes alterações na distribuição dos NMDARs gerando disfunção sináptica e morte neuronal, temos como perspectiva avaliar também a atividade de proteínas envolvidas nas vias de sinalização que atuam em conjunto com nNOS e PSD-95 na ativação desses receptores, como a proteína quinase p38, bem como avaliar a atividade do próprio receptor NMDAR, suas subunidades 2A e 2B e a morte neuronal (LI *et al.*, 2013; ZHOU, LI *et al.*, 2011).

O remodelamento da plasticidade sináptica é diretamente associado com a consolidação da memória em resposta à algum estímulo do ambiente. Esse processo é caracterizado pelo aumento de sinapses e é atuante principalmente na região do hipocampo (COLLINGRIDGE; ISAAC; WANG, 2004). Estudos demonstram que, frente a esse processo, há a estimulação de proteínas quinase A (PKA), proteínas quinase C (PKC), proteínas quinases reguladoras de sinais extracelulares 1 e 2 (Erk 1/2) e proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMK II) (AHI; RADULOVIC; SPIESS, 2004; PL; KURAMOTO; YONEDA, 2000; SWEATT, 2001). S100 β , que é uma proteína ligante de cálcio e que demonstra potencial de biomarcador para reatividade glial (THELIN *et al.*, 2016) foi avaliada no cérebro dos animais infectados com PbA. Os animais infectados e não submetidos a nenhum tipo de tratamento apresentaram níveis

aumentados significativamente de S100 β quando comparados com os animais não infectados. Da mesma forma, os animais infectados com PbA apresentem níveis aumentados de ERK 1/2. Esse quadro foi revertido, de forma significativa quando comparado com os animais infectados não tratados, a partir do tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina.

Evidências mostram que a atuação de ERK pode estar envolvida não só na regulação de funções neuronais, mas também na promoção da morte celular e patogênese da neurodegeneração (AMATO; PERRONE-CAPANO; PORZIO, 2003). Sabe-se que a via de sinalização de Erk 1/2 pode estar relacionada com PI3k/Akt no que tange à viabilidade celular e controle da apoptose (DENT, 2014). Estatinas já demonstraram efeito na neurogênese a partir da atuação na via de sinalização de Erk 1/2 e PI3k na doença de Alzheimer a partir da ativação do fator neurotrófico BDNF (WANG, CONGHUI *et al.*, 2015). Além disso, a partir da modulação por estatinas, altos níveis das GTPases Ras e Rho também parecem estar envolvidos no processo de regulação de sobrevivência celular (DENT, 2014; STANKIEWICZ; LINSEMAN, 2014).

A fim de que disfunção neuronal possa ser melhor elucidada, também foi avaliada a expressão do fator neurotrófico BDNF, essa proteína está envolvida na sobrevivência neuronal, sendo essencial para o processo de formação e consolidação da memória de longo prazo, bem como para a plasticidade e função sináptica (IZQUIERDO, IVÁN ANTONIO *et al.*, 2013). De acordo com Comim e colaboradores (2012), camundongos infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com drogas antimaláricas logo após o aparecimento dos sinais clínicos de MC apresentam além do déficit cognitivo, quantidade reduzida de BDNF no hipocampo (COMIM *et al.*, 2012). Tais dados são condizentes com os achados do presente trabalho em que animais infectados não tratados exibiram níveis de BDNF em sua forma madura inferiores significativamente quando comparados com os animais não infectados e infectados tratados. Assim sendo, um possível mecanismo para perda de memória pode implicar o controle da produção de BDNF e possivelmente o receptor de NMDA.

Estudos demonstram que a disfunção cognitiva é amplamente observada em doenças e/ou infecções sistêmicas de caráter neurodegenerativo, ou seja, que apresentam neuroinflamação assim como a MC (COMIM *et al.*, 2012; GETZ; LEVIN, 2017). Desse modo, no presente trabalho, a função cognitiva dos animais infectados com

PbA submetidos ou não ao tratamento com rosuvastatina foi avaliada a partir de dois testes comportamentais: o teste de congelamento condicionado (*freezing*) e o labirinto aquático de Morris (*water maze*), ambos realizados no 15º dia pós infecção. Esses testes possibilitam a avaliação tanto da memória aversiva, contextual e também espacial. É evidente que os animais infectados e tratados somente com o antimalárico cloroquina apresentaram um menor tempo de latência no teste de *freezing* e um menor tempo de permanência em torno do local em que a plataforma estava localizada no teste de *water maze*, indicando perda da função cognitivo.

O desbalanço de NMDARs evidenciado pelos níveis de proteínas sinápticas e marcadores de neurodegeneração previamente citados pode ter favorecido o comprometimento cognitivo no modelo. O tratamento com apenas 10 mg/kg de rosuvastatina aliado ao tratamento com o antimalárico cloroquina gerou um aumento do tempo de latência e do tempo de permanência no local da plataforma em comparação com os animais infectados com PbA e somente submetidos ao tratamento com o antimalárico (REIS *et al.*, 2012). Dessa forma, como demonstrado por estudos *in vivo* envolvendo indivíduos previamente acometidos (BANGIRANA *et al.*, 2011; IDRO *et al.*, 2010) e modelos experimentais de indução de MC (REIS *et al.*, 2010), o comprometimento neuronal e consequente déficit cognitivo gerado a partir da MC não se dá somente pela presença do parasita no hospedeiro mas a partir de uma série de mecanismos moleculares desencadeados na região cerebral a partir dessa infecção sistêmica.

Conclusões

No presente estudo, utilizando o modelo experimental de malária cerebral com camundongos machos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei ANKA*, avaliamos o papel do tratamento com rosuvastatina na redução dos eventos envolvidos na patogênese da malária cerebral, bem como dos danos cognitivos decorrentes da doença. Em conclusão, foi demonstrado que:

- O tratamento com 10 mg/kg de rosuvastatina não afetou a parasitemia ou a sobrevivência dos animais durante a infecção com *Plasmodium berghei ANKA*;
- Rosuvastatina a 10 mg/kg foi capaz de reduzir o escore de gravidade. No entanto, o desenvolvimento de malária grave não foi impedido nos animais. Essa proteção não foi observada pelo tratamento com as outras doses de rosuvastatina;
- Rosuvastatina exerce bastante efeito no que concerne à inflamação, o que impacta a neuroinflamação gerada pelo modelo experimental de MC a partir da modulação das células da glia e consequente inibição de citocinas pró-inflamatórias.
- Seus efeitos ainda incluem a reversão da neurotoxicidade através da redução do estresse oxidativo, bem como a neuroproteção conferida frente à disfunção sináptica.
- Rosuvastatina é capaz de evitar o comprometimento cognitivo, sugerindo um papel neuroprotetor em animais que sobreviveram a malária cerebral após o tratamento com antimaláricos. Dessa forma, rosuvastatina oferece sustentação para estratégias terapêuticas frente à disfunção neurocognitiva.

Perspectivas

Em camundongos machos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA e tratados com rosuvastatina, há como perspectiva:

- Avaliação da morte neuronal;
- Avaliação da ativação de células gliais através da técnica de imunohistoquímica;
- Avaliação da expressão das demais GTPases.

Referências bibliográficas

- AELST, Linda Van; SOUZA-SCHOREY, Crislyn D. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development*, v. 11, n. 516, p. 2295–2322, 1997.
- AGUILAR, Ruth *et al.* Blood oxidative stress markers and Plasmodium falciparum malaria in non-immune African children. *British Journal of Haematology*, v. 164, p. 438–450, 2014.
- AHI, Janak; RADULOVIC, Jelena; SPIESS, Joachim. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behavioural Brain Research*, v. 149, p. 17–31, 2004.
- AHN, Chang Ho; CHOI, Sung Hee. New drugs for treating dyslipidemia: Beyond statins. *Diabetes and Metabolism Journal*, v. 39, n. 2, p. 87–94, 2015.
- AIKAWA, Masanori *et al.* Metalloproteinases and Tissue Factor In Vivo and In Vitro. *Journal of the American Heart Association*, v. 103, p. 276–283, 2001.
- ALBERTS, Alfred W. Lovastatin and Simvastatin - Inhibitors of HMG CoA Reductase and Cholesterol Biosynthesis. *HMG CoA Reductase Inhibitors Cardiology*, v. 77, p. 14–21, 1990.
- ALBERTS, Alfred W. Discovery, Biochemistry and Biology of Lovastatin. *The American Journal of Cardiology*, v. 62, 1988.
- ALMEIDA, Igor C; GAZZINELLI, Ricardo T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi : structural and functional analyses Abstract : A strong activation of macrophages is. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, n. October, p. 467–477, 2001.
- ALONSO, Pedro L. *et al.* A research Agenda to underpin Malaria Eradication. *PLoS Medicine*, v. 8, n. 1, 2011.
- AMATO, Luca Colucci-d; PERRONE-CAPANO, Carla; PORZIO, Umberto. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *BioEssays*, v. 25, n. 11, p. 1085–1095, 2003.
- ANTINORI, Spinello *et al.* Biology of f Human Malaria Plasmodia Including Plasmodium Knowlesi. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, 2012.
- BALDUINI, Walter *et al.* Prophylactic but Not Delayed Administration of Simvastatin

Protects Against Long-Lasting Cognitive and Morphological mRNA Induction , and Does Not Affect Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Stroke*, p. 2007–2012, 2003.

BANGIRANA, Paul *et al.* Malaria with neurological involvement in Ugandan children : effect on cognitive ability , academic achievement and behaviour. *Malaria Journal*, v. 10, n. 334, p. 1–7, 2011.

BANO, Daniele *et al.* Cleavage of the Plasma Membrane Na⁺ / Ca²⁺ Exchanger in Excitotoxicity. *Cell*, v. 120, p. 275–285, 2005.

BARBALAT, Roman *et al.* Nucleic Acid Recognition by the Innate Immune System. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011.

BARONE, Eugenio *et al.* Long-term high-dose atorvastatin decreases brain oxidative and nitrosative stress in a preclinical model of Alzheimer disease: a novel mechanism of action. *Pharmacol Res.*, v. 63, n. 3, p. 172–180, 2012.

BASU, Srikanta. Malaria : An Update. *Indian J Pediatr*, 2017.

BESTEIRO, Sébastien; DUBREMETZ, Jean-françois. Microreview The moving junction of apicomplexan parasites : a key. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 6, p. 797–805, 2011.

BIENVENU, ANNE-LISE; PICOT, Stéphane. Statins Alone Are Ineffective in Cerebral Malaria but Potentiate Artesunate □. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 4203–4204, 2008.

BIESALSKI, Hans K. Free radical theory of aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 5, p. 5–10, 2002.

BILLKER, O; MILLER, A J; SINDEN, R E. Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement : implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology*, v. 120, p. 547–551, 2000.

BLOODSWORTH, Allison; DONNELL, Valerie B O; FREEMAN, Bruce A. Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein Oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000.

BLUM, Conrad. Comparison of Properties of Four Inhibitors of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase. *Am J Cardiol*, v. 73, p. 3–11, 1994.

BROWN, Heidi *et al.* BLOOD-BRAIN BARRIER FUNCTION IN CEREBRAL MALARIA IN MALAWIAN CHILDREN. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 64, n. 3,4, p. 207–213, 2001.

BUFFET, Pierre a *et al.* The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans : insights from splenic physiology Review article The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans : insights from splenic physiology. *The*

American Society of Hematology, v. 117, n. 2, p. 381–392, 2013.

C LIM, E HANSEN, T M. DESIMONE, Y MORENO, K JUNKER, A BEI, C BRUGNARA, C O. BUCKEE, And M T. Duraisingh. Expansion of host cellular niche can drive adaptation of a zoonotic malaria parasite to humans. *Nat Commun.*, v. 4, n. 1638, 2013.

CANAVESE, Miriam; SPACCAPELO, Roberta. Protective or pathogenic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) as potential biomarker in cerebral malaria. *Pathogens and Global Health*, v. 108, n. 2, p. 67–75, 2014.

CARTER, Julie A *et al.* Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Tropical Medicine and International Health*, v. 10, n. 1, p. 3–10, 2005.

CARVAJAL, Francisco J; MATTISON, Hayley A; CERPA, Waldo. Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. *Neural Plasticity*, v. 2016, p. 20, 2016.

CARVALHO, Leonardo J. M. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol.*, v. 26, n. 6, p. 271–272, 2011.

CASTILLA GUERRA, Luis *et al.* Statins in stroke prevention: What an internist should know. *European Journal of Internal Medicine*, v. 19, n. 1, p. 8–14, 2008.

CHAN, Li Jin; DIETRICH, Melanie H; NGUITRAGOOL, Wang. Plasmodium vivax Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. *Cellular Microbiology*, v. 22, p. 1–11, 2020.

CHERFILS, J.; ZEGHOUF, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 1, p. 269–309, 2013. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00003.2012>>.

COBAN, Cevayir *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 1, p. 19–25, 2005.

COLLINGRIDGE, Graham L; ISAAC, John T R; WANG, Yu Tian. RECEPTOR TRAFFICKING AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Nature Reviews*, v. 5, p. 952–962, 2004.

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*, v. 523, n. 2, p. 104–107, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.051>>.

COPPI, Alida *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium

Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Cells. *Cell Host & Microbe*, v. 2, n. 5, p. 316–327, 2008.

CORSINI, Alberto *et al.* New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 84, p. 413–428, 1999.

COWMAN, Alan F *et al.* Review Malaria : Biology and Disease. *Cell*, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>>.

COWMAN, Alan F *et al.* Review The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host and Microbe*, v. 22, n. 2, p. 232–245, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>>.

DANSETTE, P M; JAOEN, M; PONS, C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Experimental and toxicologic pathology*, v. 52, n. 2, p. 145–148, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993\(00\)80107-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993(00)80107-4)>.

DARWISH, Hala *et al.* Simvastatin and environmental enrichment effect on recognition and temporal order memory after mild-to-moderate traumatic brain injury. *Brain Injury*, v. 28, n. 2, p. 211–226, 2014.

DE MOURA CARVALHO, Leonardo José *et al.* Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 577–588, 2014.

DENT, Paul. Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival. *Cancer Biology & Therapy*, v. 15, n. 3, p. 245–246, 2014.

DEROOST, Katrien *et al.* *The immunological balance between host and parasite in malaria*. [S.l.: s.n.], 2015.

DI, Pericle *et al.* Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia – reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovascular Research*, v. 66, p. 462–471, 2005.

DONDORP, Arjen M *et al.* Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label , randomised trial. *The Lancet*, v. 376, n. 9753, p. 1647–1657, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61924-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61924-1)>.

DOROVINI-ZIS, Katerina *et al.* The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children. *The American journal of pathology*, v. 178, n. 5, p. 2146–2158,

2011.

DUNST, Josefina; KAMENA, Faustin; MATUSCHEWSKI, Kai. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, 2017.

EL-HUSSEINI, ALaa El-Din *et al.* PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. *Science*, v. 290, n. November, 2000.

ELIZABETH U. CANNINO; R.S. BRAY, R. E. Sinden. Gametocyte and gamete development in Plasmodium falciparum. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 201, p. 375–399, 1978.

ENDERS, Mathias *et al.* Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) -CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 8880–8885, 1998.

FEHER, L Z *et al.* ROSUVASTATIN ENHANCES ANTI-INFLAMMATORY AND INHIBITS PRO-INFLAMMATORY FUNCTIONS IN CULTURED MICROGLIAL CELLS. *Neuroscience*, p. 17, 2015.

FEINTUCH, Catherine Manix *et al.* Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children. *American Society for Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2016.

FERREIRA, Ana *et al.* Sickle Hemoglobin Confers Tolerance to Plasmodium Infection. *Cell*, v. 145, p. 398–409, 2007.

FIEDLER, Ulrike *et al.* Angiotensin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 235–239, 2006.

FIGUEIREDO, Rodrigo T *et al.* Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4 *. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 2007.

GAMBA, Paola *et al.* Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer ' s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 7, p. 1–21, 2015.

GARDONI, F *et al.* Hippocampal Synaptic Plasticity Involves Competition between Ca²⁺ / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Postsynaptic Density 95 for Binding to the NR2A Subunit of the NMDA Receptor. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 5, p. 1501–1509, 2001.

GAUT, Joseph P *et al.* Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *The Journal*

of Clinical Investigation, v. 109, n. 10, p. 1311–1319, 2002.

GAZZINELLI, Ricardo T; KALANTARI, Parisa; FITZGERALD, Katherine A. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, n. October, p. 1–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3742>>.

GETZ, Sarah J; LEVIN, Bonnie. Cognitive and Neuropsychiatric Features of Early Parkinson ' s Disease. *Archives of Clinical Neuropsychology*, v. 32, p. 769–785, 2017.

GIBSON, Christopher J *et al.* Inflammatory Regulation of ATP Binding Cassette Efflux Transporter Expression and Function in Microglia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 343, n. 3, p. 650–660, 2012.

GLASS, Christopher K *et al.* Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 918–934, 2010.

GRAMAGLIA, Irene *et al.* Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine*, v. 12, n. 12, p. 1417–1422, 2006.

GRIENBERGER, Christine; KONNERTH, Arthur. Primer Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, v. 73, n. 5, p. 862–885, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>>.

HALL, Alan. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*, v. 509, n. 1998, 2012.

HALL, Alan. Small gtp-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v. 10, p. 31–54, 1994.

HANSON, Josh *et al.* Microvascular obstruction and endothelial activation are independently associated with the clinical manifestations of severe falciparum malaria in adults : an observational study. *BMC Medicine*, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0365-9>>.

HARAMAKI, Nobuya *et al.* Fluvastatin Alters Platelet Aggregability in Patients With Hypercholesterolemia Possible Improvement of Intraplatelet Redox Imbalance via. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, p. 1471–1477, 2007.

HEMPEL, Casper *et al.* Systemic and cerebral vascular endothelial growth factor levels increase in murine cerebral malaria along with increased calpain and caspase activity and can be reduced by erythropoietin treatment. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUN, p. 1–9, 2014.

HERNÁNDEZ-ROMERO, María Del Carmen *et al.* Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral

injection of lipopolysaccharide. *Journal of Neurochemistry*, v. 105, n. 2, p. 445–459, 2008.

HERRERA, Raul *et al.* Reversible Conformational Change in the Plasmodium falciparum. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 10, p. 3771–3780, 2015.

HEYDE, Henri C Van Der *et al.* A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria : sequestration , inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 11, 2006.

HIGGINS, Sarah J; KAIN, Kevin C; LILES, W Conrad. Immunopathogenesis of falciparum malaria : implications for adjunctive therapy in the management of severe and cerebral malaria. *Expert Rev*, v. 9, n. 9, p. 803–819, 2011.

HIRAOKA, Megumi *et al.* MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway. *Life Sciences*, v. 75, n. 11, p. 1333–1341, 2004.

HÖGLUND, K; WALLIN, A; BLENNOW, K. Effect of statins on beta-amyloid metabolism in humans: potential importance for the development of senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, v. 185, n. 16, p. 87–92, 2006.

HUNT, Nicholas H. *et al.* Cerebral malaria: gamma-interferon redux. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 4, n. August, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00113/abstract>>.

HUNT, Nicholas H. Central nervous system in cerebral malaria : ‘ Innocent bystander ’ or active participant in the induction of immunopathology ? *Immunology and Cell Biology*, v. 79, p. 101–120, 2001.

HUNT, Nicholas H; GRAU, Georges E. Cytokines : accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology*, v. 24, n. 9, p. 491–499, 2006.

IDRO, Richard *et al.* Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Research Notes*, v. 3, n. 104, p. 2–7, 2010.

INGEBRIGTSEN, Tor; ROMNER, Bertil; KOCK-JENSEN, Carsten. Scandinavian Guidelines for Initial Management of Minimal , Mild , and Moderate Head Injuries MATERIALS AND METHODS. *The Journal of Trauma*, v. 48, n. 4, 2000.

ISABELLE M. MEDANA, NICHOLAS H. HUNT AND TAILOI CHAN-LING. Early Activation of Microglia in the Pathogenesis of Fatal. *Glia*, v. 103, n. 19, p. 91–103, 1997.

ISCHIROPOULOS, Harry. Biological Tyrosine Nitration : A Pathophysiological Function

of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 356, n. 1, p. 1–11, 1998.

ISHII, Hirotaka *et al.* Enhancement of nitric oxide production by association of nitric oxide synthase with N -methyl- D -aspartate receptors via postsynaptic density 95 in genetically engineered Chinese hamster ovary cells : real-time fluorescence imaging using nitric oxide sen. *Journal of Neurochemistry*, v. 96, p. 1531–1539, 2006.

ISHINO, Tomoko *et al.* Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer. *PLOS Biology*, v. 2, n. 1, p. 77–84, 2004.

ISTVAN, Eva S. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases : related enzymes with distinct architectures. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 11, p. 746–751, 2001.

ISTVAN, Eva S *et al.* Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3083663> Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science, New Series*, v. 292, n. 5519, p. 1160–1164, 2016.

ISTVAN, Eva S; LOUIS, St. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *American Heart Journal*, 2002.

IZQUIERDO, Iván Antonio *et al.* Memória : tipos e mecanismos – achados recentes. *Revista USP*, v. 98, p. 9–16, 2013.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane R G; MYSKIW, Jociane C. Fear memory. *Physiol Rev.*, v. 96, p. 695–750, 2016.

IZQUIERDO, Ivan; MEDINA, Jorge H. Memory Formation : The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 316, n. 68, p. 285–316, 1997.

JANI, Dewal *et al.* HDP — A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 4, 2008.

JARAMILLO, Maritza *et al.* Synthetic Plasmodium-Like Hemozoin Activates the Immune Response : A Morphology - Function Study. *PLoS ONE*, v. 4, n. 9, 2009.

JIANG, H. *et al.* The serum protein levels of the tPA-BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment. *Translational Psychiatry*, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2017.

JOHNSON, Derek S; CHEN, Youhai H. Ras Family of Small GTPases In Immunity And Inflammation. *Curr Opin Pharmacol.*, v. 12, n. 4, p. 458–463, 2012.

KINRA, P. AND DUTTA, V. Serum TNF alpha levels : a prognostic marker for. *Tropical Biomedicine*, v. 30, n. 4, p. 645–653, 2013.

KOBBE, Robin; SCHREIBER, Nadine; JACOBS, Thomas. Simvastatin Treatment Shows No Effect on the Incidence of Cerebral Malaria or Parasitemia during Experimental Malaria □. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 1583–1584, 2008.

KRISHNEGOWDA, Gowdahalli *et al.* Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, 2005.

KUREISHI, Yasuko *et al.* The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, v. 6, n. 9, p. 1004–1010, 2010.

LAUFS, U; LIAO, J K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 37, p. 24266–24271, 1998.

LAUFS, Ulrich; ENDRES, Matthias; *et al.* Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest.*, v. 106, n. 1, p. 15–24, 2000.

LAUFS, Ulrich; GERTZ, Karen; *et al.* Thrombocytes , Decreases Platelet Activation , and Protects From Cerebral Ischemia in Normocholesterolemic Mice. *Stroke*, v. 31, p. 2442–2449, 2000.

LI, Li-li *et al.* The nNOS-p38MAPK Pathway Is Mediated by NOS1AP during Neuronal Death. v. 33, n. 19, p. 8185–8201, 2013.

LIAO, James K.; LAUFS, Ulrich. Pleiotropic Effects of Statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 89–118, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748>>.

LIM, Caeul *et al.* Reticulocyte Preference and Stage Development of Plasmodium vivax Isolates. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 214, p. 1081–1084, 2016.

LIM, Indra A *et al.* Disruption of the NMDA receptor – PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect PDZ1-2. *Neuro Pharmacology*, v. 45, p. 738–754, 2003.

LIM, Sher Wei *et al.* Simvastatin Therapy in the Acute Stage of Traumatic Brain Injury Attenuates Brain Trauma-Induced Depression-Like Behavior in Rats by Reducing

Neuroinflammation in the Hippocampus. *Neurocritical Care*, v. 26, n. 1, p. 122–132, 2017.

LOPEZT, M *et al.* Mevinolin : A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 77, n. 7, p. 3957–3961, 1980.

LU, Dunyue *et al.* Subjected to Traumatic Brain Injury. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*, v. 21, n. 1, p. 21–32, 2004.

MAHMOOD, Asim *et al.* Long-lasting benefits after treatment of traumatic brain injury (TBI) in rats with combination therapy of marrow stromal cells (MSCS) and simvastatin. *Journal of Neurotrauma*, v. 25, n. 12, p. 1441–1447, 2008. Disponível em: <<http://ezproxy.library.uvic.ca/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=psyh&AN=2009-02464-005&site=ehost-live&scope=site%5Cnrcid:0000-0001-9770-6031%5Cnhttp://nsaam@neuro.hfh.edu>>.

MAHMOOD, Asim *et al.* Long-term benefits after treatment of traumatic brain injury with simvastatin in rats. *Neurosurgery*, v. 65, n. 1, p. 187–191, 2009.

MANEEN, Matthew J; CIPOLLA, Marilyn J. Peroxynitrite diminishes myogenic tone in cerebral arteries: role of nitrotyrosine and F-actin. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 292, n. 2, p. H1042–H1050, 2007.

MATUS-AMAT, Patricia *et al.* The Role of the Dorsal Hippocampus in the Acquisition and Retrieval of Context Memory Representations. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 10, p. 2431–2439, 2004.

MCKENZIE, F Ellis; COLLINS, William E. Gametocytemia and fever in human malaria infections. *J Parasitol.*, v. 93, n. 3, p. 627–633, 2007.

MCTAGGART, Fergus *et al.* Preclinical and Clinical Pharmacology of Rosuvastatin , a New 3-Hydroxy- 3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitor. *Am J Cardiol*, v. 87, p. 3–7, 2001.

MEDANA, Isabelle M; IDRO, Richard; NEWTON, Charles R J C. Axonal and astrocyte injury markers in the cerebrospinal fluid of Kenyan children with severe malaria. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 258, p. 93–98, 2007.

MILNER, Danny A. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, p. 1–11, 2018.

MOON, Robert W *et al.* Normocyte-binding protein required for human erythrocyte

invasion by the zoonotic malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *PNAS*, v. 113, n. 26, p. 7231–7236, 2016.

MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 11, n. 1, p. 47–60, 1984.

MUÑOZ, Manuel F; PUEBLA, Mariela; FIGUEROA, Xavier F. Control of the neurovascular coupling by nitric oxide-dependent regulation of astrocytic Ca²⁺ signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 9, p. 1–9, 2015.

MURPHY, Sean C *et al.* Review Article : Malaria Diagnostics in Clinical Trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 89, n. 5, p. 824–839, 2013.

NEILL, Luke A J O; GOLENBOCK, Douglas; BOWIE, Andrew G. redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3446>>.

NEVIAN, Thomas; SAKMANN, Bert. Spine Ca²⁺ Signaling in Spike-Timing-Dependent Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 43, p. 11001–11013, 2006.

NICHOLAS J WHITE, SASITHON PUKRITTAYAKAMEE, TRAN TINH HIEN, M ABUL FAIZ, OLUGBENGA A MOKUOLU, Arjen M Dondorp. Malaria. *The Lancet*, v. 383, p. 723–735, 2013.

NICKENIG, Georg *et al.* Rosuvastatin , a new HMG-CoA reductase inhibitor , upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Research*, v. 942, p. 23–30, 2002.

NIZ, Mariana De *et al.* Plasmodium gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Science Advances*, v. 4, p. 1–16, 2018.

OLUWAYEMI, Isaac Oludare *et al.* Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan African Medical Journal*, v. 15, p. 1–9, 2013.

OMKUMAR, Rajeevkumar Raveendran Sudarsana Devi Suma Priya Madhavan Mayadevi Mathew Steephan Thankayyan R. Santhoshkumar John Cheriyan Rajendran Sanalkumar Kurup K. Pradeep Jackson James Ramakrishnapillai V. Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Neurochemistry*, v. 110, p. 92–105, 2009.

OTTERDAL, Kari *et al.* Soluble markers of neutrophil , T-cell and monocyte activation are associated with disease severity and parasitemia in falciparum malaria. *BMC*

Infectious Diseases, v. 18, n. 670, p. 1–8, 2018.

PAMPLONA, Ana *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine*, v. 13, n. 6, p. 703–710, 2007.

PANG, Petti T. Cleavage of proBDNF by tPA / Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity. *Science*, v. 487, n. 2004, 2004.

PARIS, Daniel *et al.* Vasoactive effects of A β in isolated human cerebrovessels and in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Role of inflammation. *Neurological Research*, v. 25, n. 6, p. 642–651, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/016164103101201940>>.

PARROCHE, Peggy *et al.* Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *PNAS*, v. 104, n. 6, p. 1–6, 2007.

PENTKOWSKI, Nathan S *et al.* Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 23, n. November 2005, p. 2185–2196, 2006.

PH, M D D *et al.* Simvastatin attenuates microglia, astrocyte activation and decreases IL-1 β Level following traumatic brain injury. *Neurosurgery*, v. 65, n. 1, p. 179–186, 2010.

PL, Jan; KURAMOTO, Nobuyuki; YONEDA, Yukio. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life sciences*, v. 67, 2000.

POH, Chek Meng; HOWLAND, Shanshan W; GROTENBREG, Gijsbert M. Damage to the Blood-Brain Barrier during Experimental Cerebral Malaria Results from Synergistic Effects of CD8 γ T Cells with. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 11, p. 4854–4864, 2014.

PRASANNAVENKATESH DURAI, Rajiv Gandhi Govindaraj and Sangdun Choi. *Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum*. [S.l: s.n.], 2013.

QUE, Ivo *et al.* Murine malaria parasite sequestration : CD36 is the major receptor , but cerebral pathology is unlinked. *PNAS*, v. 102, n. 32, p. 11468–11473, 2005.

RASHID, Mamunur *et al.* Importance of Rac1 Signaling Pathway Inhibition in the Pleiotropic Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Circulation Journal*, v. 73, p. 361–370, 2009.

RASMUSSEN, Lars M *et al.* the expression of VCAM-1 and E-selectin in endothelial

cells. *Biochem J*, v. 370, p. 363–370, 2001.

RAY, R S; KATYAL, Anju. Myeloperoxidase: Bridging the gap in Neurodegeneration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.031>>.

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*, v. 6, n. 6, 2010.

REIS, Patricia A. *et al.* Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 12, 2012.

REZAIE-MAJD, Abdolreza *et al.* Simvastatin Reduces the Expression of Adhesion Molecules in Circulating Monocytes From Hypercholesterolemic Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 397–403, 2003.

RIGLAR, David T *et al.* Article Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte. *Cell Host and Microbe*, v. 9, n. 1, p. 9–20, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.003>>.

RISCO-CASTILLO, Veronica; TOPC, Selma. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles Article Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host & Microbe*, v. 18, p. 593–603, 2015.

RODWELL, Victor W *et al.* *Regulation of HMG-CoA Reductase*. [S.I.]: ACADEMIC PRESS, INC., 1976. v. 14. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-024914-5.50008-5>>.

ROGERS, Derek C. *et al.* Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome*, v. 8, n. 10, p. 711–713, 1997.

RUDIN, Werner *et al.* Resistance to cerebral malaria in tumor necrosis factor- α/β -deficient mice is associated with a reduction of intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and T helper type 1 response. *American Journal of Pathology*, v. 150, n. 1, p. 257–266, 1997.

RUSTAY, Nathan; BROWMAN, Kaitlin; CURZON, Peter. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *methods of behavior analysis in neuroscience, Second Edition*, p. 19–37, 2008.

SANDERS, Matthew J; WILTGEN, Brian J; FANSELOW, Michael S. The place of the

hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 217–223, 2003.

SAVOIA, Claudia *et al.* Rosuvastatin-induced neuroprotection in cortical neurons exposed to OGD/reoxygenation is due to nitric oxide inhibition and ERK1/2 pathway activation. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, v. 3, n. 1, p. 57–64, 2011.

SCALIA, Rosario *et al.* Simvastatin Exerts Both Anti-inflammatory and Cardioprotective Effects in Apolipoprotein E – Deficient Mice. *Circulation Journal*, p. 2598–2603, 2001.

SCHOFIELD, Louis; NOVAKOVIC, Susanna; SCHWARZ, Ralph T.

Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kin. *The Journal of Immunology*, v. 156, p. 1886–1896, 1996.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The Inflammasomes. *Cell*, v. 140, p. 821–832, 2010.

SERGHIDES, Lena *et al.* Inhaled Nitric Oxide Reduces Endothelial Activation and Parasite Accumulation in the Brain , and Enhances Survival in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, 2011.

SHIO, Marina Tiemi *et al.* Malarial Hemozoin Activates the NLRP3 Inflammasome through Lyn and Syk Kinases. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 8, 2009.

SILAMUT, K *et al.* A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *The American journal of pathology*, v. 155, n. 2, p. 395–410, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65136-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65136-X)>.

SINDEN, R. E. *Sexual Development of Malarial Parasites*. [S.l: s.n.], 1983. v. 22.

SOFRONIEW, Michael V; VINTERS, Harry V. Astrocytes : biology and pathology. *Acta Neuropathol*, v. 119, p. 7–35, 2010.

SOURAUD, Jean-baptiste *et al.* Atorvastatin treatment is effective when used in combination with mefloquine in an experimental cerebral malaria murine model. *Malaria Journal*, v. 11, n. 13, p. 1–9, 2012.

SOUZA, Thaíze Lopes De *et al.* Cerebral Malaria Causes Enduring Behavioral and Molecular Changes in Mice Brain Without Causing Gross Histopathological Damage. *Neuroscience*, v. 369, p. 66–75, 2018.

STAMATOVIC, Svetlana M *et al.* Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction ' opening ': signaling via Rho and Rho kinase. *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 22, 2003.

STANKIEWICZ, Trisha R; LINSEMAN, Daniel A. Rho family GTPases : key players in neuronal development , neuronal survival , and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 1–14, 2014.

STORM, Janet; CRAIG, Alister G. Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 4, n. July, p. 100, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120958>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4114466>>.

STÜVE, Olaf *et al.* Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Current Opinion in Neurology*, v. 16, n. 3, p. 393–401, 2003.

SUH, Kathryn N; KAIN, Kevin C; KEYSTONE, Jay S. Malaria. *JAMC*, v. 170, n. 11, p. 1693–1702, 2004.

SWEATT, J David. The neuronal MAP kinase cascade : a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry*, v. 76, p. 1–10, 2001.

TAFT, Christine E; TURRIGIANO, Gina G; TURRIGIANO, Gina G. PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts. *Phil. Trans. R. Soc.*, v. 369, n. 20130134, 2014.

TAKEMOTO, Masao; SUN, Jianxin; HIROKI, Junko. Rho-Kinase Mediates Hypoxia-Induced Downregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation Journal*, v. 106, p. 57–62, 2002.

TANG, X. N. *et al.* Apocynin improves outcome in experimental stroke with a narrow dose range. *Neuroscience*, v. 154, n. 2, p. 556–562, 2008.

TAOUFIQ, Zacharie *et al.* Atorvastatin prevents Plasmodium falciparum cytoadherence and endothelial damage. *Malaria Journal*, v. 10, n. 52, p. 1–9, 2011.

TAOUFIQ, Zacharie *et al.* Rho Kinase Inhibition in Severe Malaria : Thwarting Parasite-Induced Collateral Damage to Endothelia. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 197, 2008.

TAVARES, Joana *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver

infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 5, p. 905–915, 2013.

TAYLOR, F *et al.* Statins for the primary prevention of cardiovascular disease (Review). *Cochrane review*, n. 1, 2013.

TAYLOR, Terrie E *et al.* Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem. *Nature Medicine*, v. 10, n. 2, p. 986–988, 2004.

THAM, Wai-hong; BEESON, James G; RAYNER, Julian C. Plasmodium vivax vaccine research – we ’ ve only just begun. *International Journal for Parasitology*, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.006>>.

THELIN, Eric Peter *et al.* Utility of neuron-specific enolase in traumatic brain injury ; relations to S100B levels , outcome , and extracranial injury severity. *Critical Care*, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13054-016-1450-y>>.

TOBERT, Jonathan A. LOVASTATIN AND BEYOND: THE HISTORY OF THE HMG-COA REDUCTASE INHIBITORS. *Nature Reviews*, v. 2, 2003.

TORRENTINO-MADAMET, Marylin *et al.* Atorvastatin Is a Promising Partner for Antimalarial Drugs in Treatment of Plasmodium falciparum Malaria □. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 6, p. 2248–2252, 2009.

TOSEVSKI, Vinko *et al.* Gamma Interferon Mediates Experimental Cerebral Malaria by Signaling within Both the Hematopoietic and Nonhematopoietic Compartments. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 11, p. 1–13, 2017.

UEHATA, Masayoshi; ISHIZAKI, Toshimasa; SATOH, Hiroyuki. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, v. 389, 1997.

VAUGHAN, Carl J *et al.* The Evolving Role of Statins in the Management of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 35, n. 1, 2000.

VIANNA, M R *et al.* Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 72, p. 353–64, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11028100>>.

VIANNA, Monica R M *et al.* Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learning & Memory*, v. 7, p. 333–340, 2000.

VONDER HAAR, Cole *et al.* Comparison of the Effect of Minocycline and Simvastatin on

Functional Recovery and Gene Expression in a Rat Traumatic Brain Injury Model. *Journal of Neurotrauma*, v. 31, n. 10, p. 961–975, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/neu.2013.3119>>.

WAGENER, Frank A D T G *et al.* Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System. *Pharmacol Res.*, v. 55, n. 3, p. 551–571, 2003.

WANG, Conghui *et al.* Simvastatin prevents b-amyloid25e35-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through a7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology*, v. 97, p. 122–132, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.020>>.

WANG, Hui; PENG, Rui-yun. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Military Medical Research*, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40779-016-0095-0>>.

WANG, Qing *et al.* Statins: Multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurology*, v. 230, n. 1, p. 27–34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.04.006>>.

WASSMANN, Sven *et al.* Inhibition of Geranylgeranylation Reduces Angiotensin II-Mediated Free Radical Production in Vascular Smooth Muscle Cells : Involvement of Angiotensin AT1 Receptor Expression and Rac1 GTPase. *Molecular Pharmacology*, v. 59, n. 3, p. 646–654, 2001.

WEISS, Greta E *et al.* Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*, p. 1–25, 2015.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 2, p. 172–173, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/524889>>.

WHO. Guidelines for the treatment of malaria - 3rd edition. 2015.

WHO. *World malaria report 2019*. Geneva. [S.l.: s.n.], 2019.

WON, Sehoon *et al.* PSD-95 stabilizes NMDA receptors by inducing the degradation of STEP 61. *PNAS*, 2016.

XIE, Chuncheng *et al.* The effect of simvastatin treatment on proliferation and differentiation of neural stem cells after traumatic brain injury. *Brain Research*, v. 1602,

n. C, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.03.021>>.

YAMADA, Kiyofumi; NABESHIMA, Toshitaka. Current Perspective Brain-Derived Neurotrophic Factor / TrkB Signaling in Memory Processes. *J Pharmacol*, v. 270, p. 267–270, 2003.

YANG, Yupeng *et al.* Developmental switch in requirement for PKA RII β in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses. *Neuropharmacology*, v. 56, n. 1, p. 56–65, 2010.

YEO, Tsin W *et al.* Decreased Endothelial Nitric Oxide Bioavailability , Impaired Microvascular Function , and Increased Tissue Oxygen Consumption in Children With Falciparum Malaria. *The Journal of infectious diseases*, v. 210, p. 1627–1632, 2014.

YEO, Tsin W *et al.* Increased Carboxyhemoglobin in Adult Falciparum Malaria is Associated With Disease Severity and Mortality. *Brief report*, v. 208, p. 813–817, 2013.

YUKI, Dai *et al.* DHA-PC and PSD-95 decrease after loss of synaptophysin and before neuronal loss in patients with Alzheimer’s disease. *Scientific Reports*, v. 4, n. 7130, 2014.

ZAMVIL, Scott S; STEINMAN, Lawrence. Cholesterol-lowering statins possess anti-inflammatory activity that might be. *Neurology*, v. 59, p. 970–971, 2002.

ZHOU, Li *et al.* Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia- induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nature Medicine*, v. 16, n. 12, p. 4–10, 2011.

ZHOU, Qian; LIAO, James K. Pleiotropic Effects of Statins. *Circulation Journal*, v. 74, 2010.