

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz - IOC
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

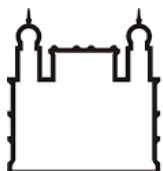
**ESTUDO DO PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) NA
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

TATHIANY IGREJA DA SILVA

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Co-orientador (a): Dr.^a Patrícia Alves Reis

Rio de Janeiro
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz - IOC
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TATHIANY IGREJA DA SILVA

**ESTUDO DO PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)
NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Co-orientador (a): Dr.^a Patrícia Alves Reis

Rio de Janeiro

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Tathiany Igreja da

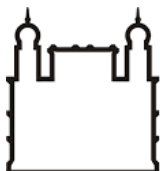
Estudo do papel da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na malária cerebral experimental / Tathiany Igreja da Silva. – Rio de Janeiro, 2017. xvi, 91 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Bibliografia: f. 72-91

1. Malária cerebral. 2. Óxido nítrico. 3. Estresse oxidativo. 4. Dano cognitivo. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz - IOC
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: TATHIANY IGREJA DA SILVA

**ESTUDO DO PAPEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) NA
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Co-Orientador (a): Dr^a Patrícia Alves Reis

Aprovada em: 16/02/2017

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Leonardo José de Moura Carvalho – IOC – FIOCRUZ/RJ

Dr.^a Clarissa Martinelli Comim Cassol – Universidade do Extremo Sul
Catarinense –UNESC/SC

Dr.^a Mariana Conceição de Souza – Farmanguinhos – FIOCRUZ/RJ

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar forças, paciência e determinação, imprescindíveis para o êxito desta etapa.

Agradeço aos meus orientadores o Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e a Dr.^a Patrícia Alves Reis pela orientação e paciência. Ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, agradeço por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de trabalhar na sua equipe de excelentes pesquisadores; agradeço, ainda, pelos ensinamentos adquiridos ao longo deste trabalho. À Dr.^a Patrícia Alves Reis, agradeço a dedicação, a compreensão, por ser solícita e paciente ao me instruir, por me incentivar e, principalmente, por sempre acreditar na minha capacidade e no meu trabalho!

Agradeço aos meus pais que, apesar dos percalços, sempre me incentivaram e lutaram para que eu alcançasse meus objetivos. Em especial, a minha mãe pelos seus ensinamentos, por me instruir sobre a importância do saber e me mostrar o valor da dedicação e da perseverança.

Às minhas avós, Leci e Itamar, pelo amor e carinho, principalmente, na falta dos meus pais.

À minha irmã, Bruna, e ao meu namorado, Laerte, que estiveram comigo nesse processo, me apoiando incondicionalmente.

Aos meus colegas de equipe, Leandro Andrade Chinalia, Luciana Domett Siqueira, Emilio Telles e Natasha Lisboa pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo apoio dentro e fora da bancada!

Aos demais amigos do laboratório de Imunofarmacologia, especialmente, IsaClaudia Gomes de Azevedo-Quintanilha, André Costa Ferreira e Isabel Matos pela disponibilidade, pelo apoio e carinho!

À secretária do laboratório, Rose Branco, por nos ajudar nas questões administrativas e por sua amizade.

Aos componentes da banca pela gentileza de aceitarem o convite!

E a todos que contribuíram de alguma forma para que essa tese se tornasse realidade!

RESUMO

Estudo do papel da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na malária cerebral experimental

Silva, Tathiany Igreja da

A malária é uma das doenças infecciosas de maior importância mundial e ocasiona cerca de 500 mil mortes ao ano. A doença ocorre devido a transmissão de protozoários do gênero *Plasmodium*. A malária cerebral é a principal “causa mortis” observada e ocorre, principalmente, nas infecções por *Plasmodium falciparum*. O principal grupo atingido são crianças com faixa etária abaixo dos cinco anos de idade. A malária cerebral se caracteriza pelo sequestro de hemácias parasitadas nos microvasos cerebrais e pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada. Os sintomas fisiopatológicos observados são: liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células endoteliais e leucócitos, além do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que podem levar à quebra da barreira hematoencefálica e à ativação de células do sistema nervoso central, como microglia e astrócitos. Esses eventos podem ocasionar danos ao tecido cerebral e gerar déficit cognitivo. O óxido nítrico (NO) é uma molécula controversa na malária cerebral. Durante a patogênese da doença, ocorre o aumento da disponibilidade de NO devido a maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Quando em excesso, o NO pode reagir com ROS e formar espécies reativas de nitrogênio (RNS) extremamente deletérias, como o peroxinitrito (ONOO⁻). O objetivo deste trabalho é analisar o papel da iNOS na patogênese da malária cerebral e as sequelas cognitivas observadas. Para isso, utilizamos o modelo de infecção com *Plasmodium berghei ANKA* em camundongos C57BL/6 *wild-type* e *knockouts* para a enzima iNOS. Além do uso de iNOS^{-/-}, utilizamos a aminoguanidina, uma droga que inibe especificamente a enzima iNOS. Os animais foram submetidos à análise de sinais da malária grave no 6º dia após a infecção. No mesmo dia, amostras de sangue e cérebro, foram coletadas para proceder as análises bioquímicas e moleculares. Realizamos análises de cognição através de testes comportamentais de memória espacial e aversiva nos dias 15 e 16 após a infecção. Esses testes foram realizados após 7 dias de tratamento com antimalárico (cloroquina – 25 mg/kg v.o.). Averiguamos que a ausência de iNOS ofereceu proteção quanto a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas (ROS/RNS), além de reduzir a atividade de mieloperoxidase (MPO). Ainda, o bloqueio da enzima foi eficaz em reduzir a expressão de ICAM-1 e a produção de TNF- α cerebral, bem como em reduzir a ativação de células gliais e a morte neuronal apoptótica em virtude da diminuição da clivagem de caspase-3 detectada. Ambas as estratégias foram eficientes em prevenir o desenvolvimento de sequelas cognitivas. Este estudo busca a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da malária cerebral e o encontro de novos alvos terapêuticos que atuem na prevenção da disfunção cognitiva associada.

ABSTRACT

Study of the role of the inducible nitric oxide synthases (iNOS) in the experimental cerebral malaria

Silva, Tathiany Igreja

Malaria is one of the most important global infectious diseases and causes about 500,000 deaths each year. The disease occurs due to the transmission of the protozoa of the genus *Plasmodium*. Cerebral malaria is the main cause of death observed and occurs mainly in infections with *Plasmodium falciparum*. Children under five years are the main affected group. Cerebral malaria is characterized by sequestration of parasitized erythrocytes in the small cerebral vessels and by the development of an exacerbated inflammatory response. Pathophysiological symptoms observed are release of pro-inflammatory cytokines, endothelial cells and leukocytes activation, in addition to the increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, which can lead to disruption of the blood-brain barrier and the activation of cells, such as microglia and astrocytes in the central nervous system. These events can cause damage to brain tissue and cause cognitive deficit. Nitric oxide (NO) is a controversial molecule in cerebral malaria. During the pathogenesis of the disease, the NO availability increases due to the upregulation of inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS). When in excess, can react with ROS forming reactive nitrogen species (RNS), as the peroxynitrite (ONOO^-), extremely harmful. The aim of this study is analyze the role of iNOS in the pathogenesis of cerebral malaria. We used the model of infection with *Plasmodium berghei ANKA* in C57BL/6 *wild-type* and iNOS *knockouts* mice. In addition to the use iNOS^{-/-}, aminoguanidine, an inhibitor of iNOS, was also used. The animals were submitted to analysis of signs of severe malaria on the sixth day after the infection. On the same day, blood and brain samples were collected to perform biochemical and molecular analysis. We performed cognitive analysis through behavioral tests of spatial and aversion memory on the 15^o and 16^o days after infection. These tests were performed after 7 days of antimalarial treatment (chloroquine-25 mg/kg v.o.) We found that the absence of iNOS provided protection against the release of proinflammatory cytokines and reactive species (ROS / RNS), in addition to reducing myeloperoxidase activity (MPO). Still, enzyme blockade was effective in reducing the expression of ICAM-1 and the production of brain TNF- α , as well as in reducing glial cell activation and apoptotic neuronal death due to the decrease in the detected caspase-3 cleavage. Both strategies have been effective in preventing the development of cognitive sequelae. This study seeks better understanding of the mechanisms involved in the pathophysiology of cerebral malaria and the identification of new therapeutic targets that act to prevent the associated cognitive damage.

Lista de Siglas e Abreviaturas:

AIF	- Fator de indução de apoptose (<i>apoptosis-inducing factor</i>)
AMA-1	- Antígeno 1 da membrana apical (apical membrane antigen-1)
AMPA	- α - amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATP	- Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine triphosphate</i>)
ACT	- Terapia combinada de artemisina
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do cérebro (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BCA	- Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
BH4	- Tetra-hidrobiopterina (<i>4-hydrobiopterin</i>)
CAMKII	- Cálcio-calmodulina quinase II
Célula NK	- Células <i>Natural Killer</i>
Cox-2	- Ciclooxygenase-2
CS	- Proteína circunsporozoíta (<i>Circumsporozoite protein</i>)
CSA	- Sulfato de condroetina A
CXC	- Receptor de quimiocina (<i>Chemokine receptor</i>)
DDT	- Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial (<i>Endothelial nitric oxide sintase</i>)
FAD	- Dinucleotídeo de Flavina (<i>Flavin Dinucleotide</i>)
FP	- Ferroprotoporfirina
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
GP-IV	- Glicoproteína IV de plaqueta
Hp	- Haptoglobina

HPR-2	- Proteína 2 rica em histidina (histidine rich-protein 2)
HOCL	- Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
INF-γ	- Interferon gama
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide sintase</i>)
IP-10	- Proteína inflamatória-10 (<i>Inflammatory protein-10</i>)
LDH	- Desidrogenase láctica (<i>lactic dehydrogenase</i>)
LFA-1	- Antígeno 1 associado a função linfocitária (lymphocyte function- associated antigen-1)
LT	- Linfotoxinas
LTP	- Potenciação de longa duração (<i>long-term potenciacion</i>)
MCE	- Malária cerebral experimental
MDA	- Malondialdeído
MIP	- Proteína inflamatória macrofágica (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
MIF	- Fator inibitório da migração do macrófago (<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>)
MPO	- Mieloperoxidase
MSP-1	- Proteína 1 da superfície do merozoíta (Merozoite surface protein 1)
NADPH-oxidase	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>)
NAD+	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NMDA	- N-Methyl-D aspartate
NO	- Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOS	- Óxido nítrico sintase (<i>Nitric oxide sintase</i>)

nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal (<i>Neuronal nitric oxide sintase</i>)
NRL	- Receptores NOD-like
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	- Peroxinitrito
PAMPs	- Padrões moleculares associados à patógeno (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PARP-1	- Poly [ADP-ribose] polymerase-1
PbA	- <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PfEMP-1	- Proteína 1 de membrana eritrocítica do <i>P. falciparum</i>
PF4	- Fator plaquetário 4 (<i>platelet factor 4</i>)
PK	- Proteína quinase (Protein kinase)
RBC	- Hemácias (<i>Red blood cell</i>)
RLR	- Receptores RIG-I-like
RNS	- Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive nitrogen species</i>)
RON	- Rhoptry Neck proteins
ROS	- Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RRP	- Receptores de reconhecimento padrão
RTD	- Diagnóstico de teste rápido (<i>rapid test diagnostic</i>)
SHIRPA	- S mithKline Beecham, H arwell, I mperial College and R oyal London Hospital P henotype A ssessment
SNC	- Sistema nervoso central
SPECT	- Proteína do micronema do esporozoíta essencial a travessia (<i>sporozoite microneme protein essencial for transversal</i>)
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid-reactive substances</i>)
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)

- TSP - Trombospondina
- TRAP - Proteína adesiva relacionada à trombospondina (*Trombospondin-related-adhesive protein*)
- TRL - Receptores semelhantes ao Toll (*Toll-like receptors*)
- VCAM-1 - Molécula de adesão vascular-1 (*Vascular cell adhesion protein-1*)
- VLA-1 - Antígeno 1 muito tardio (very late antigen-1)

Lista de Figuras:

Figura 1 – Áreas com ocorrência de malária no mundo (Mudança nos últimos 16 anos)	3
Figura 2 - Áreas com ocorrência de malária no Brasil.....	5
Figura 3 - Ciclo de vida do parasita da malária.....	8
Figura 4 - Implicações do Óxido Nítrico no Sistema Nervoso Central e efeitos associados a neurodegeneração.....	20
Figura 5 – Via de sinalização glutamatérgica disparada no processo de formação e consolidação de memória.....	25
Figura 6 - Circuito nervoso hipocampal relacionado ao processo de formação e consolidação de memória.....	27
Figura 7 - Avaliação de curva de mortalidade e parasitemia de camundongos C57BL/6 <i>wild-type</i> e <i>iNOS^{-/-}</i>	41
Figura 8 - Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 <i>wild-types</i> e <i>iNOS^{-/-}</i>	42
Figura 9 - Avaliação de dano cognitivo em camundongos <i>iNOS^{-/-}</i> infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> pelos testes de esQUIVA inibitória.....	43
Figura 10 - Avaliação de dano cognitivo em camundongos <i>iNOS^{-/-}</i> infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> pelo teste freezing.....	44
Figura 11 - Avaliação da capacidade de aprendizado de camundongos <i>iNOS^{-/-}</i> durante a malária cerebral experimental através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze)	45
Figura 12 - Avaliação da expressão de <i>iNOS</i> em camundongos <i>iNOS^{-/-}</i> infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i>	46
Figura 13 - Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos <i>iNOS^{-/-}</i> infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i>	47
Figura 14 - Avaliação de estresse oxidativo no tecido cerebral de camundongos <i>wild-type</i> e <i>iNOS^{-/-}</i> infectados ou não com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> no 6º dia após a infecção.....	48
Figura 15 - Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos <i>wild-type</i> e <i>iNOS^{-/-}</i> infectados ou não com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> no 6º dia após a infecção.....	49

Figura 16 - Avaliação de curva de mortalidade e parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina.....	50
Figura 17 - Avaliação do escore clínico em camundongos C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina.....	51
Figura 18 - Avaliação de dano cognitivo pelo teste freezing em camundongos infectados tratados ou não com aminoguanidina.....	52
Figura 19 - Avaliação da capacidade de aprendizado e memória espacial em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze).....	53
Figura 20 - Avaliação da expressão de ICAM-1 em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina.....	54
Figura 21 - Avaliação da expressão de TNF- α no cérebro de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina.....	55
Figura 22 - Avaliação da ativação de microglia em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina.....	56
Figura 23 - Avaliação da expressão de iNOS em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina.....	57
Figura 24 - Avaliação dos níveis de caspase-3 clivada em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com aminoguanidina.....	58
Figura 25 - Avaliação da capacidade de aprendizado e memória espacial em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA tratados ou não com 7-nitroindazol através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze).....	60

Lista de Tabelas:

Tabela 1 – Cepas de *Plasmodium sp.* que infectam diferentes linhagens de camundongos usadas em modelos murinos experimentais 23

SUMÁRIO:

1. Introdução.....	1
1.1 Malária.....	1
1.1.1 Definição e Origem.....	1
1.1.2 Epidemiologia e Controle.....	3
1.1.3 Ciclo do parasita.....	7
1.2 Malária Cerebral.....	10
1.2.1 Fisiopatologia.....	10
1.2.2 Papel do Óxido Nítrico (NO) na malária cerebral	16
1.3 Modelos Experimentais.....	22
1.4. Disfunção Cognitiva.....	24
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Metodologia.....	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Manutenção e Infecção.....	30
3.3 Parasitemia e Sobrevida.....	30
3.4 Escore clínico de avaliação de dano neurológico.....	31
3.5 Drogas administradas.....	31
3.6 Testes Comportamentais.....	31
3.6.1 Esquiva Inibitória.....	32
3.6.2 Freezing.....	32
3.6.3 Labirinto Aquático de Morris.....	32
3.7 Coleta de Amostras.....	33
3.7.1 Sangue.....	33
3.7.2 Cérebros.....	33
3.8 Dosagem de proteínas pelo método do BCA.....	33
3.9 Testes de avaliação de estresse oxidativo.....	34
3.9.1 Avaliação de peroxidação lipídica pelo TBARS.....	34
3.9.2 Dosagem de grupamentos tióis totais.....	34
3.10 Análise de atividade de mieloperoxidase (MPO) cerebral.....	35
3.11 Dosagem de citocinas através do ensaio imunoabsorção ligado à Enzima (ELISA).....	35
3.12 Western Blotting.....	36
3.13 Quantificação da expressão de mRNA.....	37
3.13.1 Transcrição reversa do RNA (RT).....	38

3.13.2 Reação em cadeia de polimerase qualitativo (PCR- RT).....	38
3.13.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativo (q PCR Real Time).....	39
3.14 Imunohistoquímica.....	39
3.15 Análise estatística.....	40
4. Resultados.....	41
4.1 Avaliação da mortalidade e parasitemia em camundongos iNOS ^{-/-} susceptíveis a infecção com <i>Plasmodium berghei ANKA</i>	41
4.2 Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 iNOS ^{-/-} no modelo de malária cerebral experimental.....	41
4.3 Avaliação cognitiva de camundongos C57BL/6 iNOS ^{-/-} durante a malária cerebral experimental.....	42
4.4 Avaliação da expressão de iNOS em camundongos iNOS ^{-/-} durante a malária cerebral experimental.....	45
4.5 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 iNOS ^{-/-} infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i>	46
4.6 Avaliação da produção de espécies reativas em camundongos C57BL/6 iNOS ^{-/-} durante malária cerebral experimental.....	47
4.7 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) em camundongos C57BL/6 iNOS ^{-/-} durante a malária cerebral experimental....	48
4.8 Avaliação de mortalidade e parasitemia em camundongos C57BL/6 submetidos à inibição farmacológico da enzima iNOS através do tratamento com aminoguanidina.....	49
4.9 Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 tratados com a droga aminoguanidina durante a malária cerebral experimental.....	50
4.10 Avaliação do dano cognitivo em camundongos C57BL/6 submetidos à inibição de iNOS pelo tratamento com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental.....	51
4.11 Avaliação da expressão de moléculas de adesão em camundongo C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina.....	53
4.12 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> tratados com aminoguanidina.....	54
4.13 Avaliação da ativação de Microglia em Camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental.....	55
4.14 Avaliação da expressão de iNOS em camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental.....	57

4.15 Avaliação de apoptose neuronal em camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental.....	57
4.16 Avaliação do bloqueio de nNOS na disfunção cognitiva observada durante a malária cerebral experimental.....	59
5. Discussão.....	61
6. Conclusões.....	70
7. Perspectivas.....	71
8. Bibliografia.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Definição e Origem

A malária é uma doença grave que ocorre pela infecção por protozoários do gênero *Plasmodium* transmitidos ao hospedeiro através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é, ainda nos dias de hoje, um grave problema de saúde pública e gera cerca de 500 mil mortes a cada ano (OMS, 2016).

Os relatos sobre a origem da doença são confusos, porém acredita-se que tenha surgido no continente africano, e se difundindo, posteriormente, para as regiões da Europa, Ásia e América (Cunha and Cunha, 2010). Apesar disso, registros chineses de 2700 anos a.C., papiros egípcios de 1500 anos a.C. e textos hindus de mais 600 anos a.C. aparentemente já ofereciam alguns indícios da existência da doença. Os primeiros gregos observaram sintomas de febre e o aumento do baço encontrados em pessoas que viviam em regiões pantanosas (Cox *et al.*, 2010).

O termo malária surgiu no século XVIII, oriundo do italiano mal'aire (ar insalubre), a partir da difusão da idéia que a doença ocorria pelo ar emanado dos pântanos. Em 1880, o cirurgião do exército francês, Charles Louis Alfonse Laveran, foi o primeiro a descobrir o parasita causador da doença (Cox *et al.*, 2010, Cox *et al.*, 2016). Ele observou, no sangue de um paciente com febre de 15 dias, que elementos filiformes se moviam com grande vivacidade nas bordas de corpos esféricos pigmentados deslocando os glóbulos vermelhos vizinhos (CDC, Malaria, History, 2015). Nessa época, quase nada se sabia sobre o modo de transmissão da doença até que, em 1897, o médico britânico Ronald Ross descobriu que a doença era transmitida através da picada de mosquitos, a partir de observações da ocorrência de malária em pássaros após a picada de mosquitos culicídeos (Cox *et al.*, 2016). Com esses dados, Ross acreditava que a transmissão em humanos ocorria do mesmo modo. Porém, foi em meados de 1898 que isso foi demonstrado pelos malariologistas italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Battista Grassi. Eles concluíram os estudos referentes a forma de transmissão

humana, demonstrando de forma conclusiva que a ocorrência da malária humana é, de fato, decorrente da transmissão do parasita por mosquitos, sendo neste caso, mosquitos anofelinos (Cox *et al.*, 2010; Majori *et al.*, 2012; Cox *et al.*, 2016). O ciclo de vida completo do parasita, no entanto, só foi desvendado em 1947, quando Henry Shortt e Cyril Garnham puderam demonstrar que o ciclo do parasita possuía duas fases: uma fase anterior ao estágio eritrocítico e que ocorria no fígado, a fase exoeritrocítica, e o estágio sanguíneo, a fase eritrocítica (Cox *et al.*, 2016).

Atualmente, a malária humana pode ocorrer a partir da infecção de seis diferentes espécies conhecidas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, 2 subespécies de *Plasmodium ovale* (*P. ovale curtsi* e *P. ovale wallikeri*) (Calderaro *et al.*, 2013) e *Plasmodium knowlesi*, descoberto mais recentemente na Malásia e regiões do Sudeste Asiático. (White, 2008; Pasini *et al.*, 2016).

Os sintomas clínicos da malária observados em, aproximadamente, 10 a 15 dias após a picada do vetor, são febre alta, calafrios, náuseas e/ou vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais (OMS, 2016). A malária pode se tornar complicada em alguns casos, mais comumente nas infecções por *P. falciparum*, em que pode haver o estabelecimento de anemia grave, disfunções do fígado e pulmões, alterações metabólicas, e malária cerebral associada a comprometimento neurológico (Rénia *et al.*, 2012; Cowman *et al.*, 2016).

Alguns estudos relatam que a infecção por outras espécies de *Plasmodium* também podem levar à casos mais graves (Cowman *et al.*, 2016). Já tem sido demonstrado que o fenômeno de citoaderência, melhor evidenciado nas infecções por *P. falciparum*, pode também ocorrer nas infecções por *P. vivax* e *P. knowlesi*, estando aparentemente envolvido em múltiplas complicações (Craig *et al.*, 2012; Fatih *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). Recentemente, um trabalho relatou a ocorrência de malária cerebral em um indivíduo infectado por *Plasmodium vivax* (Gupta *et al.*, 2016). No entanto, os eventos mais observados nos casos de gravidade associados a infecções por *Plasmodium* não-falciparum são anemia grave e complicações respiratórias (Anstey *et al.*, 2009; Rahimi *et al.*, 2014; Cowman *et al.*, 2016).

1.1.2 Epidemiologia e Controle

A malária é uma das doenças de maior morbidade e mortalidade no mundo, portanto, uma das principais doenças parasitárias existentes. A cada ano, mais de 200 milhões de novos casos são notificados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), em 2015, foram 212 milhões de casos registrados e 429 mil mortes.

Aproximadamente metade da população mundial está sob risco de contrair a doença, mas o número de casos da doença vem reduzindo ao longo dos anos (OMS, 2016). A Figura 1 mostra a distribuição mundial de malária, e destaca as mudanças ocorridas desde o ano de 2000 até dias atuais. No mapa, ainda podemos observar que a maior concentração dos casos ocorre na região localizada entre os trópicos.

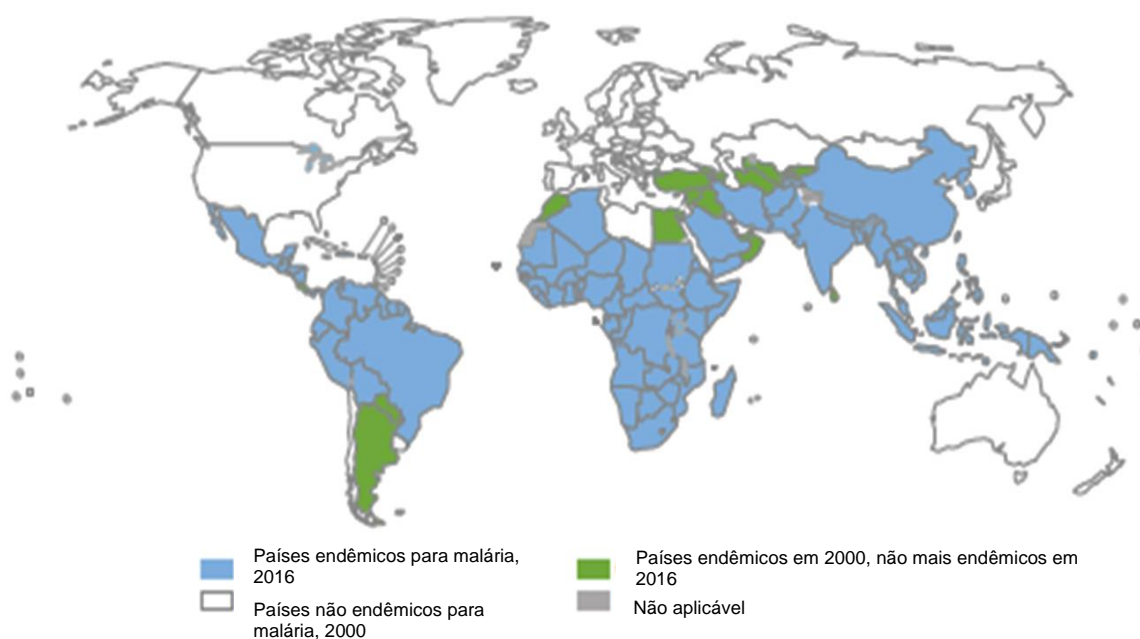


Figura 1. Áreas com ocorrência de malária no mundo (Mudança nos últimos 16 anos). Distribuição dos casos de malária ao redor do mundo entre os anos de 2000 e 2016, destacando a mudança de endemidade no decorrer desses 16 anos (OMS, 2016).

A malária é uma doença típica de países pobres e clima tropical. As condições climáticas das áreas de risco são propícias ao desenvolvimento dos vetores, possuindo condições ideais de temperatura e umidade. Além disso, algumas espécies de *Anopheles* têm preferência por se alimentar de humanos,

sendo chamadas espécies antropofílicas, o que favorece a transmissão da malária em humanos (Rossati *et al.*, 2016).

O continente africano é a principal área acometida, registrando a maioria de casos e mortes por malária. Os registros mostram que 90% dos óbitos ocorrem na África devido a infecções causadas, principalmente, por *P. falciparum*. A África Subsaariana apresenta o maior número de vítimas, que corresponde, em sua maioria, a crianças abaixo dos 5 anos de idade, mulheres grávidas, idosos e adultos com algum tipo de imunocomprometimento (OMS, 2016). Apesar disso, regiões da Ásia, da América Latina, pequenas extensões do Oriente Médio e porções europeias também são afetadas (OMS, 2016).

Nas Américas, mais de 100 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Segundo o relatório mais recente da OMS, em 2015, 132 milhões estavam sob risco de contrair a doença e 21 milhões sob alto risco. Dentre os países acometidos neste continente, 5 deles (Belize, República Dominicana, Equador, El Salvador e México) estão em fase de pré-eliminação e 3 (Argentina, Costa Rica e Paraguai) em fase de eliminação da doença. O *Plasmodium vivax* é o principal agente nessa região, sendo responsável por mais de 70% dos casos observados (OMS, 2016).

Aproximadamente, metade das mortes por malária nas Américas ocorre no Brasil. Em 2015, o país foi responsável por 24% da incidência dos casos de malária, somando infecções com *P. vivax* e *P. falciparum* (OMS, 2016). O Brasil apresenta grande parte da transmissão (99%) ocorrida na Região Amazônica ou Amazônia Legal, composta pelos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. As espécies de plasmódio encontradas no Brasil são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, mais raramente. O *P. vivax* é o de maior prevalência no país, registrando atualmente 88% dos casos. As infecções por *P. falciparum* estão em segundo lugar e correspondem aos 12% restantes (OMS, 2016).

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 habitantes e sem risco são as áreas com IPA menor de 1 caso/1000 habitantes. A

Figura 2, mostra o mapa mais recente de classificação de risco de transmissão de malária nos municípios do Brasil.

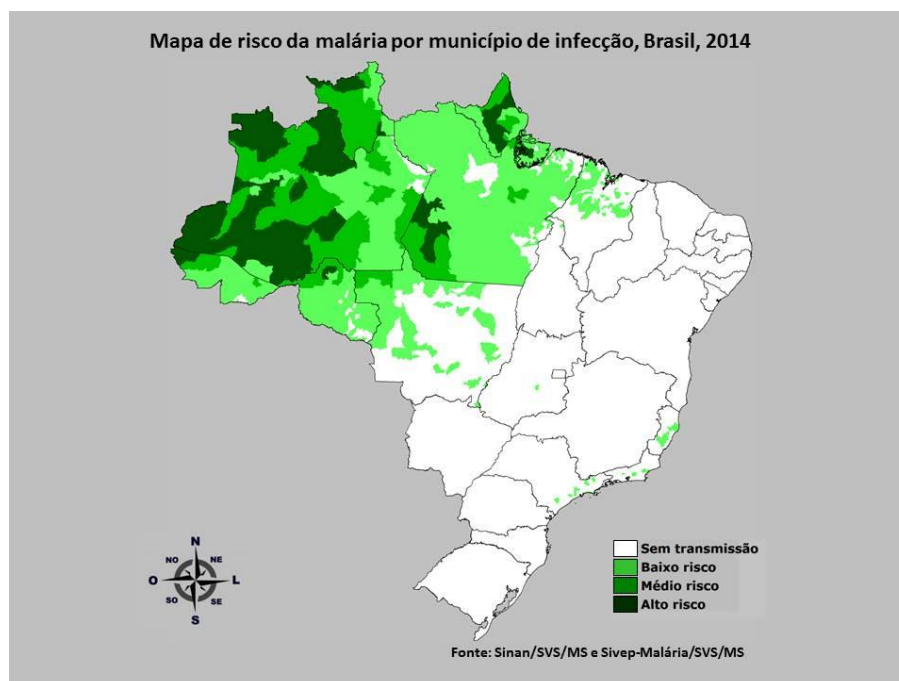


Figura 2: Áreas com ocorrência de Malária no Brasil. No Brasil os municípios são classificados de acordo com o índice parasitário anual em alto risco ≥ 50 casos/1000 habitantes, de médio risco entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco < 10 casos/1000 habitante e sem risco < 1 caso/1000 habitantes. SIVEP, 2014

O controle de epidemias de malária tem sido uma busca constante da Organização Mundial de Saúde. Como resultado da realização de campanhas de erradicação observa-se que, desde 2000, já houve queda de cerca de 60% na mortalidade global (OMS, 2016). As estratégias de controle se baseiam em 3 fatores: diagnóstico, tratamento imediato e controle do vetor. Atualmente, também têm sido discutidas estratégias de imunização. Uma vacina em potencial, a RST, S/AS01, encontra-se em fase 3 nos estudos clínicos e tem demonstrado alguma eficácia na redução dos casos de malária grave, especialmente em indivíduos jovens (White *et al.*, 2015). Ainda, como estratégia mais recente, se tem discutido a utilização de parasitas atenuados geneticamente (Kublin *et al.*, 2017).

O diagnóstico precoce e a precisão do mesmo é muito importante e evita a evolução para quadros mais graves. A Organização Mundial da Saúde recomenda a confirmação parasitológica por microscopia ou por testes de

diagnóstico rápido (rapid diagnostic test - RTD), que utilizam anticorpos monoclonais para detecção de proteínas do parasito nos pacientes com suspeita da doença. Os principais anticorpos utilizados em RTD são HPR2 (*histidine-rich protein 2*), LDH e aldolase, sendo a primeira expressa somente em *Plasmodium falciparum* (Murphy *et al.*, 2013) No Brasil, o diagnóstico mais utilizado é o teste de gota espessa (OMS, 2016).

Após o diagnóstico, inicia-se o tratamento e, quanto mais cedo isso ocorre, maiores as chances de sobrevivência, além de se evitar possíveis complicações. Nas últimas décadas, devido à grande resistência do parasito às outras drogas, a associação de artemisinina com outros antimaláricos (ACT) tem sido o tratamento mais utilizados nas infecções por *Plasmodium falciparum*, combatendo o parasita nos estágios sanguíneos (esquizontes e gametócitos) do ciclo evolutivo (Miller *et al.*, 2013; OMS, 2016). Nas Américas, a cloroquina continua sendo utilizada nas infecções de *Plasmodium vivax*, embora já tenham sido relatados casos de resistência no Brasil. Além disso, o uso de primaquina, é necessário nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* devido à presença de formas hipnozoítas (Pukrittayakamee *et al.*, 2014).

O controle do vetor é essencial na luta contra a transmissão da doença. Os dois métodos principais utilizados atualmente são: o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, particularmente, os de longa duração (*LLIN - long-lasting insecticide-treated nets*) e a aplicação de inseticidas nas paredes internas das residências (*IRS – indoor residual spraying*) (Okumu and Moore, 2011; OMS, 2016). Atualmente, 4 classes de inseticidas têm sido utilizadas na pulverização residual: os organoclorados, os organofosforados, carbamatos e os piretróides (Turner *et al.*, 2016). Os organoclorados como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) têm como mecanismo de ação o bloqueio de canais de sódio dependente de voltagem no SNC do mosquito. Esse mesmo mecanismo é também observado na classe dos piretróides. Organofosforados e carbamatos, no entanto, atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (Hemingway, 2014; Turner *et al.*, 2016). Esses inseticidas induzem hiperexcitabilidade neuronal, causando o colapso do sistema nervoso central e a morte do mosquito (Costa, 2015).

O DDT foi um inseticida muito importante na eliminação da malária em diversos lugares do mundo inclusive em alguns estados brasileiros em meados do

século XX, especialmente, durante o Programa de Erradicação da Malária em 1960 (Rahman, 2012; Griffing *et al.*, 2015). No entanto, a descoberta de que o mesmo pode acarretar sérios problemas de saúde fez com que o inseticida fosse banido em diversos países, restringindo sua utilização apenas a regiões de maior endemicidade (Guimarães *et al.*, 2007; OMS, 2016). No Brasil, o uso de DDT está proibido desde 1997 (Guimarães *et al.*, 2007). Com o mesmo mecanismo de ação observado na classe dos organoclorados e sendo mais seguros, os piretróides têm sido a principal classe de inseticida usada como estratégia no controle dos vetores (Hemingway, 2014; OMS, 2016). Além disso, os piretróides são os únicos utilizados na impregnação dos mosquiteiros (Turner *et al.*, 2016).

1.1.3 Ciclo do Parasita

O gênero *Plasmodium* é pertencente ao filo Apicomplexa, que se caracteriza pela presença do complexo apical, estrutura importante relacionada à invasão celular (Cowman *et al.*, 2016).

O ciclo de vida das espécies parasitas que causam a malária humana se caracteriza por duas fases: uma sexuada, chamada esporogonia, e outra assexuada, a esquizogonia (Figura 3). Essas fases se passam em hospedeiros distintos, de modo que a esporogonia ocorre em hospedeiros invertebrados e a esquizogonia em vertebrados (Antinori *et al.*, 2012).

O ciclo se inicia quando, a partir da picada, o mosquito injeta formas esporozoítas no tecido subcutâneo, ou na corrente sanguínea com menor frequência, do hospedeiro vertebrado (Miller *et al.*, 2002). Os esporozoítas presentes na derme são liberados lentamente nos capilares sanguíneos até chegar ao fígado, um processo que pode levar de 1 a 3 horas (Cowman *et al.*, 2016). Essa migração também pode ocorrer pelos vasos linfáticos. No fígado, os esporozoítas invadem as células hepáticas hospedeiras e iniciam a fase pré-eritrocítica ou ciclo hepático (Antinori *et al.*, 2012).

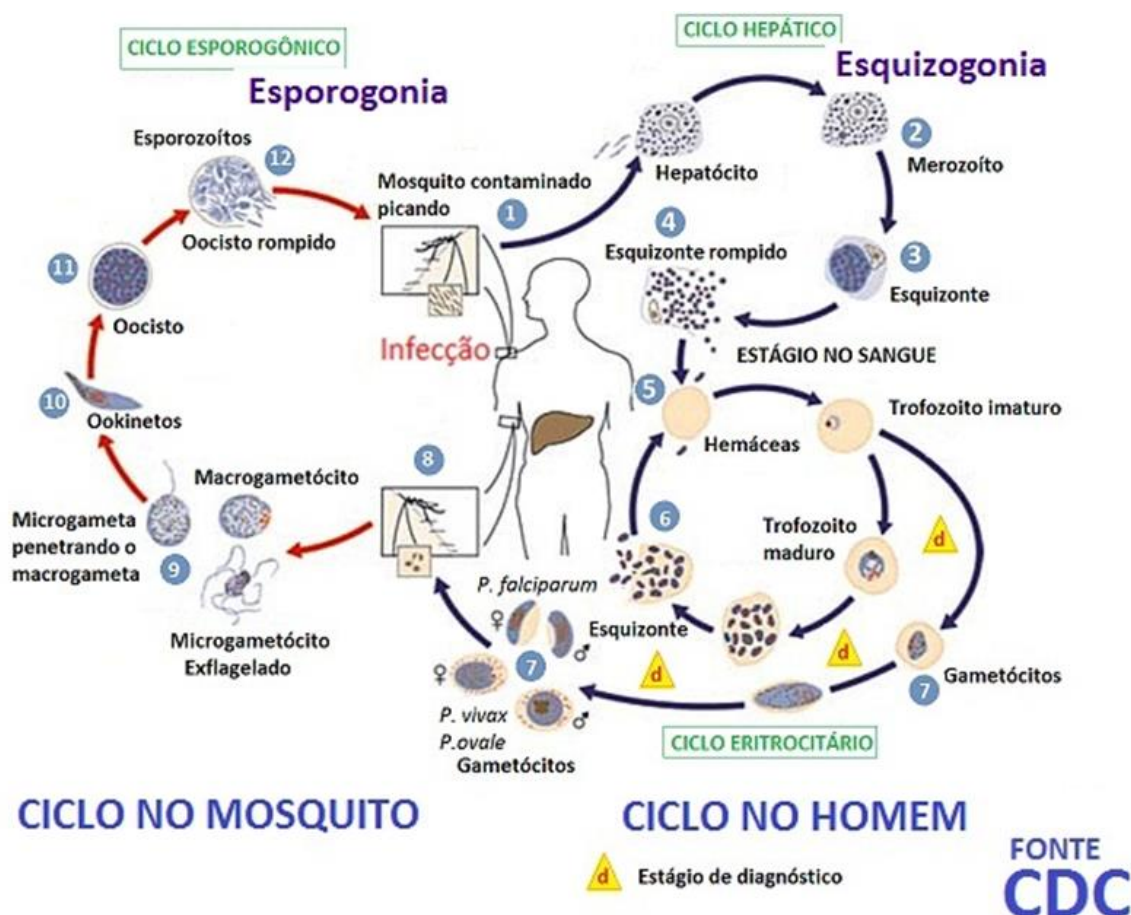


Figura 3: Ciclo de vida do parasita da malária. Adaptado do site do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

O acesso do parasita ao hepatócito ocorre, primeiramente, pela travessia de uma barreira composta por células endoteliais fenestradas e células de Kupffer (Tavares *et al.*, 2013). Esse processo tem o auxílio de algumas proteínas como SPECT (*sporozoite microneme protein essencial for transversal*), SPECT2 e outras proteínas de passagem. SPECT2 é muito importante pois possui um domínio do tipo complexo perforina de ataque a membrana, permitindo a perfuração da membrana e facilitando a travessia através das células até a chegada aos hepatócitos (Cowman *et al.*, 2016). A entrada do parasita no hepatócito ocorre a partir da interação entre moléculas do parasita e do hospedeiro, estando envolvidos o domínio de trombospondina (TSP) da proteína circunsporozoíta (CS) e as proteínas adesivas relacionadas a trombospondina (TRAP) do esporozoítio, que se ligam aos proteoglicanos de heparan sulfato expressos na superfície dos hepatócitos e nas células de Kupffer (Miller *et al.*, 2002). Dentro das células

hepáticas, os esporozoítas replicam-se e transformam-se em esquizontes contendo milhares de merozoítas que são liberados com a ruptura do hepatócito (Antinori *et al.*, 2012). O receptor hepático EphA2 é requerido para que o parasita se estabeleça dentro do hepatócito através da ligação com proteínas parasitárias p52 e p56 (Cowman *et al.*, 2016). Ainda nesta fase, formas latentes conhecidas como hipnozoítas, podem permanecer no fígado nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* e são, eventualmente responsáveis por fenômenos de recaída (Antinori *et al.*, 2012).

O parasita na sua forma merozoíta apresenta a capacidade de invadir os eritrócitos. Após a lise das células hepáticas, os merozoítos liberados passam a invadir as células vermelhas do sangue iniciando o ciclo eritrocítico da doença, em que há o aparecimento dos sinais clínicos (Cowman *et al.*, 2016).

A entrada nas hemácias pelos merozoítos passa por uma fase de pré-invasão, que se inicia com a interação entre proteína 1 da superfície do merozoíta (MSP-1 - merozoite surface protein-1) e proteínas do hospedeiro, classicamente, glicofosfatidilinositol (GPI). Com isso, é estabelecida uma plataforma que permite que os parasitas se orientem corretamente dando início à invasão dos eritrócitos. A fase de invasão tem início quando receptores encontrados nas organelas do complexo apical do parasita interagem com determinadas proteínas dos hospedeiros, tais como as proteínas do sistema sanguíneo Duffy, glicoforina A, B e C, banda 3, CD36, glicoproteína IV de plaqueta (GP-IV), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), sulfato de condroitina A (CSA), dentre outros (Miller *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2013). Em um dos eventos mais importantes associados a essa fase, proteínas do parasita, o complexo RON (Rhoptry Neck proteins), são exportadas para a membrana celular do hospedeiro e auxiliam na junção com outras proteínas formando um complexo que auxilia a entrada do parasita na hemácia (Miller *et al.*, 2013). A proteína RON 2 do complexo, exposta ao lado externo da membrana eritrocítica, se liga fortemente a AMA-1 (*apical membrane antigen-1*), o que vai levar a formação do vacúolo parasitóforo e a propulsão dos merozoítos para dentro dos eritrócitos (Cowman *et al.*, 2016).

Dentro dos eritrócitos, os trofozoítos amadurecem ao longo de 24-72 horas dependendo da espécie infectante e se replicam produzindo esquizontes que podem conter de 6 a 36 merozoítos. As hemácias infectadas se rompem por processos mediados por proteínas quinase dependentes de Ca^{+2} e um complexo

de ataque a membrana/domínio perforina, e os merozoítos liberados são capazes de infectar novas hemácias (Antinori *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Os acessos febris, típicos da malária, são caracterizados de acordo com periodicidade do ciclo eritrocítico de cada espécie. *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* provocam acessos a cada 48 horas, é a febre terçã benigna; enquanto que o *Plasmodium falciparum* com acessos durante o mesmo intervalo de tempo ocasionam a febre terçã maligna. *Plasmodium malariae* provoca a febre quartã com acessos febris a cada 72 horas; e, o mais recentemente descoberto, *Plasmodium knowlesi*, gera febre a cada 24 horas (Antinori *et al.*, 2012).

Em menor proporção, alguns trofozoítas podem amadurecer e originar gametócitos, essenciais para a transmissão da infecção a outros hospedeiros através de mosquitos anofelinos do sexo feminino. A geração de gametócitos é diferenciada entre *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo mais tardia nesses últimos (Antinori *et al.*, 2012; McQueen *et al.*, 2013). Gametócitos maduros femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) podem ser ingeridos pelo mosquito transmissor e iniciar o ciclo esporogônico, que culmina na formação das formas esporozoítas (Cowman *et al.*, 2016). Esses esporozoítas se direcionam a glândula salivar do hospedeiro vertebrado, onde permanecem até que haja um novo repasto sanguíneo seguido do reinício do processo infeccioso. (Miller *et al.*, 2002; McQueen *et al.*, 2013).

1.2. MALÁRIA CEREBRAL

1.2.1 Fisiopatologia

A malária cerebral é a forma mais grave observada nas infecções por *Plasmodium falciparum* e é descrita como uma encefalopatia difusa caracterizada clinicamente por coma, frequentemente associado a convulsões clínicas e subclínicas, podendo ainda levar a ataxia, hemi ou paraplegia e, por vezes, levar ao óbito (Coban *et al.*, 2009; Dorovanis-Zis *et al.*, 2011). O principal grupo de risco é constituído por crianças abaixo dos 5 anos de idade que vivem em áreas endêmicas, como a África Sub-saariana (Shikani *et al.*, 2012), no entanto indivíduos adultos não imunes ou semi-imunes podem desenvolver a doença (Craig *et al.*,

2012). Cerca de 15 a 20% dos indivíduos acometidos por essa patologia morrem, porém, aqueles pacientes que sobrevivem podem vir a desenvolver injúrias cerebrais que se manifestam como danos neurocognitivos a longo prazo (Ponsford *et al.*, 2012; Idro *et al.*, 2016).

A fisiopatologia da malária cerebral pode ser explicada com base em duas hipóteses: a adesão de eritrócitos parasitados nos microvasos do cérebro (citoaderência) seguido de obstrução e hipóxia local, e a ativação de uma resposta inflamatória exacerbada mediada por citocinas e células efetoras associadas à presença do parasita (Storm and Craig, 2014; Wah *et al.*, 2016).

A ação parasitária sobre os eritrócitos durante o ciclo eritrocítico culmina na destruição de milhares de células vermelhas sanguíneas (RBCs - *red blood cells*) e essa ação nociva do parasita sobre o organismo do hospedeiro leva à ativação de uma resposta imuno-inflamatória de combate à infecção (Gun *et al.*, 2014). Em uma tentativa de escape do sistema de defesa do hospedeiro, os parasitas promovem o sequestro de hemácias parasitadas em sítios distantes, evitando sua destruição na passagem por órgãos como o fígado e o baço, o que vai levar a uma série de eventos patológicos posteriores (Craig *et al.*, 2012; Hansen, 2012).

Nos eritrócitos infectados por *P. falciparum* ocorrem modificações na superfície, tornando-os mais rígidos e inflexíveis, o que dificulta a circulação e favorece a adesividade dos mesmos (Craig *et al.*, 2012). Formas maduras do parasita no estágio sanguíneo expressam proteínas parasitárias na superfície de hemácias infectadas, tais como a proteína 1 de membrana eritrocítica do *P. falciparum* (PfEMP1) que é codificada por uma grande e diversificada família de genes *var* envolvida na variação antigênica clonal (Wassmer *et al.*, 2016). Esta proteína possui multidomínios capazes de se ligar a receptores específicos, anteriormente citados, presentes nas células endoteliais do hospedeiro e é largamente associada à citoaderência e seus desdobramentos (Craig *et al.*, 2012; Adukpo *et al.*, 2013; Wassmer *et al.*, 2016). Dentre os ligantes de PfEMP-1, CD36 e ICAM-1 são os principais envolvidos no processo de citoadesão verificado nos vasos cerebrais (Gazzineli *et al.*, 2014).

Além de se ligar ao endotélio, as hemácias parasitadas podem promover ligações entre si, a chamada autoaglutinação, ou com hemácias não parasitadas

formando as rosetas (Craig *et al.*, 2012). Leucócitos e plaquetas também estão envolvidos com o sequestro celular e agravam ainda mais o quadro de obstrução dos capilares cerebrais e o processo subsequente (Wah *et al.*, 2016).

A presença do parasita é percebida pelo sistema imunológico quando, durante o ciclo eritrocítico, os merozoítos recém-formados são liberados dos eritrócitos na corrente sanguínea até invadirem um novo eritrócito (Cowman *et al.*, 2016; Gun *et al.*, 2014). Nesse processo, outros produtos da infecção também podem ser liberados e atuar como antígenos a serem reconhecidos. (Gun *et al.*, 2014). O reconhecimento imune inato do plasmódio e o subsequente lançamento de citocinas são importantes no controle da infecção, mas também podem gerar malefícios durante uma resposta desregulada (Apinjoh *et al.*, 2013).

Durante a resposta imune inata, o patógeno é reconhecido do através de seu epítipo imunogênico (Padrão Molecular Associado ao Patógeno-PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes na célula hospedeira. A família de receptores Toll-like reconhece domínios do plasmódio na superfície celular e induz a resposta imune. Receptores RIG-I-like (RLR) e NOD-like (NRL) participam do reconhecimento citosólico (Gazzinelli *et al.*, 2014). Estudos indicam que o principal PAMP dos parasitos do gênero *Plasmodium* é o Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa molécula é capaz de se ligar a receptores TLR 2 e a TLR 4 e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune ativadas, notadamente macrófagos e células dendríticas (Coban *et al.*, 2009; Apinjoh *et al.*, 2013). Glicosilfosfatidilinositol é reconhecido, preferencialmente, por heterodímeros TLR 2/TLR 1 ou TLR 2/TLR 6, em uma interação que induz a ativação de uma série de MAP quinases, tais como ERK 1/2, p38 MAPK e JNK 1/2, e culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias (Gun *et al.*, 2014). Outro possível PAMP associado à infecção é a hemozoína, um produto da metabolização do grupamento heme pelo parasita, envolvido na ativação de receptores TLR 9 e receptores citosólicos do tipo NOD em especial o receptor NLPR3, o que culmina com o recrutamento de ASC e caspase-1, o que leva a clivagem de pró-IL1 β a proteína ativa (Franklin *et al.*, 2011; Gazzinelli *et al.*, 2014).

A hemoglobina é uma proteína instável e sua retirada do organismo ocorre através da formação de um complexo estável com a proteína haptoglobina (hp). Esta proteína tem a sua capacidade suprimida durante a infecção, o que leva

a conversão de hemoglobina para metahemoglobina e, conseqüente, liberação do grupamento heme, uma molécula altamente reativa e que participa dos processos patofisiológicos relacionados a progressão da doença (Vinchi and Tolosano, 2013). O próprio heme por si quando liberado na circulação sanguínea em virtude da grande quantidade de hemoglobina lançada durante a massiva lise eritrocítica, pode ativar a resposta inflamatória ao se ligar a receptores TLR4 (Gun *et al*, 2014).

Estudos revelam que o desbalanço de citocinas pró e anti-inflamatórias está associado à imunopatogênese da malária cerebral experimental. Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas fagocitam hemácias parasitadas, o que induz a produção de citocinas (Gazzineli *et al.*,2014). Aumento nos níveis de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interferon gama (INF- γ), linfotoxinas (LT) e interleucinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12 podem ser observados, contrastando com baixos níveis de IL-10 e outras citocinas anti-inflamatórias (Hansen, 2012; Hunt *et al.*,2014; Souza *et al.*, 2015). Além disso, quimiocinas inflamatórias como MIP-1a, MIP-1b, CXCL10 e IP-10, parecem estar envolvidas no tráfego de leucócitos (Hansen *et al.*, 2012; Apinjoh *et al.*, 2013).

Dentre as citocinas, o papel do TNF- α e INF- γ tem sido largamente discutido. A citocina TNF- α tem importância no controle do desenvolvimento do parasita e é capaz de ativar a produção de fator inibitório da migração do macrófago (MIF), sendo produzida durante a ativação macrofágica e induzindo, nessas células, a produção de óxido nítrico (NO) via iNOS e também de citocinas inflamatórias. (Clark *et al.*,2006; Sahu *et al.*,2013; Gazzineli *et al.*,2014). A citocina INF- γ , por sua vez, também participa da ativação dos macrófagos, podendo induzir a produção de citocinas pirógenas endógenas como o próprio TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, além de outras citocinas associadas a severidade da infecção (Hansen, 2012; Hunt *et al.*,2014). O INF- γ é uma citocina produzida por células dendríticas e células NK ativadas por IL-12, essa citocina ativa células T e suas funções efetoras. Células TCD4⁺ são polarizadas para o perfil T helper 1 (Th1), passando a produzir mais INF- γ e reforçando a resposta imune inata. (Hansen, 2012; Gazzineli *et al.*, 2014). Além disso, INF- γ também está associada a produção de NO e radicais tóxicos (Taylor-Robinson, 2010; Bogdan, 2015)

Além do que já foi citado, a produção de TNF- α pode contribuir com a severidade da doença por induzir o aumento da expressão endotelial de moléculas

de adesão, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, o que aumenta a citoaderência na microvasculatura cerebral (Craig *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015). Já foi observado que INF- γ também atua no estímulo a expressão de moléculas de adesão, inclusive CD36 (Hunt *et al.*, 2014).

A citoaderência leva à obstrução dos microvasos cerebrais e redução do fluxo sanguíneo local que podem levar a condições de hipóxia, escassez de nutrientes e danos celulares com possíveis eventos hemorrágicos (Hansen *et al.*, 2012; Ponsford *et al.*, 2012; Rénia *et al.*, 2012). A redução crítica no suprimento de substâncias necessárias ao metabolismo cerebral caracteriza os eventos hipoglicêmicos observados no curso da patologia (Mishra and Newton, 2010).

O sequestro de células na vasculatura cerebral e a resposta inflamatória podem, ainda, interferir na integridade da barreira hematoencefálica, uma barreira protetora composta por células endoteliais, pericito, células gliais e membrana basal. (Hora *et al.*, 2016). Essa barreira seleciona a passagem de metabólitos para o tecido cerebral, o que é importante para a manutenção da homeostasia local e previne a entrada de patógenos no Sistema Nervoso Central (SNC) (Rénia *et al.*, 2012). Mishra e Newton (2010), observaram ruptura das proteínas juncionais nas células endoteliais vasculares da barreira hematoencefálica, constatado por análises pós-mortem em pacientes maláricos. Alguns autores sugerem que a oclusão dos vasos durante o sequestro celular cria um local de hipertensão que força as junções existentes entre as células do endotélio e que protegem a barreira entre o sangue e o cérebro, desse modo ocorre uma ruptura que passa a permitir a passagem de substâncias nocivas para o sistema nervoso central (Rénia *et al.*, 2012).

Como descrito anteriormente, o fenômeno de citoaderência conta não só com a participação de hemácias parasitadas, mas também com a de plaquetas ativadas e leucócitos compostos por monócitos, neutrófilos e células B e células T efetoras ativadas (TCD4⁺ e TCD8⁺) (Souza *et al.*, 2015). Os produtos secretados por células da primeira linha de defesa, neutrófilos e macrófagos, podem agir não somente no parasita, mas também auxiliar na injúria das células endoteliais. (Percário *et al.*, 2012; Wah *et al.*, 2016). A ativação plaquetária induz a liberação de mediadores inflamatórios, como tromboxanos, quimionas e citocinas, notadamente PF4, RANTES e IL-1 β , o que favorece a vasculopatia e a resposta

inflamatória (Aggrey *et al.*, 2013). O processo imuno-inflamatório estabelecido contribui tanto no aumento da permeabilidade local quanto no recrutamento de células efetoras, principalmente, as células TCD8⁺ (Rénia *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015). Essas células expressam na sua superfície LFA-1 e VLA-1, proteínas ligantes para ICAM-1 e VCAM respectivamente, e parecem ser cruciais para os eventos associados a patologia e complicações observadas, pois são responsáveis por liberar substâncias, como a perforina, que induzem à morte celular, contribuindo com o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e hemorragia vascular (Howland *et al.*, 2015; Swanson *et al.*, 2016).

O comprometimento da integridade da barreira hematoencefálica promove o extravasamento de sangue e seus componentes para o parênquima cerebral, o que leva a formação de edema. Além disso, essa ruptura permite que as células nervosas sejam expostas a mediadores inflamatórios, o que pode contribuir no estabelecimento das neuropatologias associadas a doença. (Zanini *et al.*, 2011; Craig *et al.*, 2012; Combes *et al.*, 2012).

Em situações de desafio ou sob injúrias cerebrais, as células gliais do sistema nervoso central, microglias e astrócitos, podem ser ativadas e essa ativação exacerba a resposta inflamatória local (Sochocka *et al.*, 2016). Fisiologicamente, as microglias, células conhecidas como macrófagos residentes do SNC, são responsáveis pelo monitoramento e vigilância local, mas também podem participar de funções neuroprotetoras, auxiliando a plasticidade sináptica e estimulando a neurogênese, além de remover sinapses desnecessárias (Shastri *et al.*, 2013). Os astrócitos são as células mais numerosas do SNC e estão envolvidos em diversas funções como o desenvolvimento e função neuronal, regulação do metabolismo energético e manutenção da barreira hematoencefálica (Sofroniew and Vinters, 2010; Shastri *et al.*, 2013). No entanto, quando ocorre um processo neuroinflamatório exacerbado em decorrência de insultos nocivos, essas células sofrem mudanças de função e conformação, e sua ativação excessiva pode acarretar prejuízos ao sistema, levando a produção desregulada de citocinas inflamatórias e radicais livres. As células gliais são ativadas, principalmente, por citocinas IL-1 β e TNF- α (Sochocka *et al.*, 2016). A constante ativação dessas células pode induzir lesão tecidual e neurodegeneração associada a morte

neuronal, um evento que tem sido observado em diversas desordens neurológicas, incluindo a malária cerebral (Heneka *et al.*, 2014; Shrivastava *et al.*, 2017).

Em resposta a infecções, os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro são ativados com envolvimento de fagócitos. Estes aumentam a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e RNS (espécies reativas de nitrogênio) que são parte essencial da resposta imune inata do hospedeiro (Oates *et al.*, 2006; Delhaye *et al.*, 2016). Em eventos neuropatológicos, como descrito anteriormente, as células gliais, uma vez ativadas, também participam desse processo (Mossakowski *et al.*, 2015).

O próprio grupamento heme, já comentado anteriormente, também participa da geração de radicais livres. Heme livre estimula migração de neutrófilos e produção de ROS/RNS, aumentando a resposta inflamatória e direcionando à apoptose celular (Percário *et al.*, 2012; Vinchi and Tolosano, 2013). Ainda, a degradação de hemoglobina pelo parasita pode gerar radicais tóxicos (Delhaye *et al.*, 2016).

Em condições patológicas, o aumento de ROS/RNS pode ocasionar um desbalanço entre espécies oxidativas e a atividade de antioxidantes, uma condição conhecida como estresse oxidativo (Molina Cruz *et al.*, 2007; Percário *et al.*, 2012). Citocinas pró-inflamatórias liberadas estão envolvidas na geração de ROS/RNS (Zhang *et al.*, 2011). Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzido, principalmente, por enzimas NADPH oxidases, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos intermediários de O_2 , podem agir independentemente como agentes citotóxicos ou formar outras moléculas tóxicas incluindo radicais hidroxila (OH^{\bullet}), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^-$) na presença de NO (Pino *et al.*, 2003; Percário *et al.*, 2012). O aumento dessas espécies reativas pode causar prejuízos à níveis lipídicos, de proteína ou mesmo de ácidos nucleicos, o que contribui com o agravamento do quadro já estabelecido e com progressão da doença, podendo levar a injúria tecidual e provocar neurodegeneração (Percário *et al.*, 2012; Cobb and Cole, 2015).

1.2.1 Papel do óxido nítrico (NO) na malária cerebral

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa e lipofílica que atua em múltiplas funções no organismo (Khazan and Hdayati, 2015). Esta

molécula foi identificada, originalmente, como fator de relaxamento vascular, sendo importante para o processo de vasodilatação de células endoteliais (Sobolewski *et al.*, 2005).

O óxido nítrico é produzido por uma família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina na presença de O₂ e dos co-fatores enzimáticos requeridos, tais como NADPH (Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina), FAD (Dinucleotídeo de Flavina) e BH₄ (4-hidrobiopterina) (Forstermann and Sessa, 2013). A óxido nítrico sintase (NOS) possui três isoformas: a endotelial (e-NOS ou NOS-3) e a neuronal (n-NOS ou NOS-1), que são formas constitutivas e dependentes do íon Ca⁺² para sua ativação, e a forma induzível iNOS/NOS-2, isoforma independente de Ca⁺², cuja expressão e ativação é estimulada em condições adversas na presença de mediadores envolvidos no processo inflamatório (Habib and Ali, 2011; Forstermann and Sessa, 2013; Khazan and Hdayati, 2015). As formas constitutivas eNOS e nNOS são encontradas, majoritariamente, nas células endoteliais e nos neurônios, respectivamente, enquanto, a iNOS pode ser observada na parede de células com função imunológica, como macrófagos e microglia (Yuste *et al.*, 2015; Bogdan, 2015).

Fisiologicamente, o NO apresenta outras funções no organismo atuando não apenas como fator regulador de tônus vascular, mas também como neurotransmissor ou mediador do sistema imunológico (Forstermann and Sessa, 2013; Dellamea *et al.*, 2014). Nessas condições, a molécula é produzida em baixas quantidades mantendo concentrações a nível nano molar (eNOS e nNOS - 0,2 a 2 nM; iNOS – 2 a 200nM), que, eventualmente, podem aumentar em situações patológicas, atingindo, inclusive, concentrações micro molares (Brown, 2010; Khazan and Hdayati, 2015). A molécula pode ser bioprocessada e seus níveis podem ser avaliados através de sua eliminação sob a forma de nitrato ou nitrito (Hawkes *et al.*, 2011; Khazan and Hdayati, 2015).

Sob condições patológicas, o papel do NO é muito discutido e parece ser controverso (Clark *et al.*, 2003; Hawkes *et al.*, 2011; Habib and Ali, 2011). Particularmente, em transtornos neurológicos de cunho neurodegenerativo, não se sabe se o NO auxilia na resolução ou na progressão da doença (Yuste *et al.*, 2015). Segundo Brunet (2001), o óxido nítrico pode fornecer benefícios ou

efeitos deletérios dependendo do tempo de exposição, montante de produção e do sítio biológico em que é lançado.

Em infecções parasitárias, como a malária, o óxido nítrico já foi descrito como sendo uma molécula de suma importância (Sobolewski *et al.*, 2005; Hawkes *et al.*, 2011). Muito se discursa sobre seu papel protetor nos casos de maior gravidade. Anstey e colaboradores (1996) demonstraram a existência de uma relação inversa entre a produção de NO e o estabelecimento da malária cerebral humana, sugerindo que reduções nos níveis dessa molécula possam favorecer o estabelecimento da patologia. Em outro estudo, Yeo e colaboradores (2007) constataram baixa biodisponibilidade de NO relacionada a disfunção endotelial observada em pacientes acometidos pela malária grave. O mesmo estudo relacionou a baixa de NO a reduções de seu precursor L-arginina e a captura do mesmo por moléculas “scavenging” como a hemoglobina livre, liberada em função da hemólise típica da doença. Isso também tem sido observado em modelos experimentais de malária cerebral, de modo que reduções nos níveis de NO e baixas concentrações de L-arginina parecem contribuir com a progressão da doença (Gramaglia *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013).

A produção de NO por células endoteliais mantém a homeostase local regulando o fluxo sanguíneo e a função endotelial, e níveis reduzidos dessa molécula estão associados à vasoconstrição associada a quadros de hipóxia, bem como à um estado de disfunção endotelial observado na malária cerebral humana e murina (Yeo *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2014; Kayano *et al.*, 2016). Alguns trabalhos mostram que, em modelos experimentais, doadores de NO e a reposição dos níveis de L-arginina são estratégias promissoras na prevenção da vasculopatia associada ao desenvolvimento da malária cerebral (Gramaglia *et al.*, 2006; Cabrales *et al.*, 2011; Bertinaria *et al.*, 2015). Serghides e colaboradores (2011) mostraram que o óxido nítrico induz ao aumento na expressão de angiopoietina-1 (Ang-1), que exerce efeitos anti-inflamatórios e modula atividade de Ang-2 no endotélio, reduzindo a ativação endotelial e a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), bem como reduzindo a permeabilidade vascular, o que interfere no estabelecimento da malária cerebral experimental.

Ainda em condições patológicas, a forma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) é transcrita em resposta a estímulos como citocinas pró-

inflamatórias e patógenos, o que favorece a produção de óxido nítrico em grandes quantidades (Wink *et al.*, 2011; Forstermann and Sissa, 2013). Durante a malária cerebral, isso também tem sido observado. Citocinas como INF- γ , TNF- α e IL-1 β ou produtos patogênicos como glicosilfosfatidilinositol (GPI) podem estimular a expressão de iNOS em hospedeiros infectados (Brunet, 2001; Oates *et al.*, 2006; Bogdan *et al.*, 2015).

Alguns autores sugerem que NO pode ter efeitos citotóxicos, principalmente, quando produzidos por iNOS, uma vez que esta é altamente expressa por fagócitos do sistema imune em resposta a diversos insultos, inclusive infecciosos (Brunet, 2001; Bogdan *et al.*, 2015). No entanto, alguns trabalhos já mostraram que a ausência de iNOS não interfere na replicação do parasita ou no estabelecimento da malária cerebral experimental, demonstrando que NO não é requerido para o estabelecimento da doença (Favre *et al.*, 1998; Gramaglia *et al.*, 2006). Ainda assim, muito se discursa sobre a atuação de NO em disfunções neurodegenerativas, e ao que tem sido relatado sua produção em altos níveis pode trazer danos oxidativos interferindo em várias das suas funções fisiológicas (Figura 4), inclusive, na sinalização neuronal, em que participa da plasticidade sináptica e do processo de formação e consolidação de memória (Ljubisavljevic and Stojanovic, 2015).

O óxido nítrico é uma molécula capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e interferir na neurotransmissão, um processo que pode contribuir, parcialmente, com os casos de perda de consciência ou coma reversível (Idro *et al.*, 2010 A). Nesse contexto, a produção de NO por nNOS, somado às outras fontes, incluindo iNOS, é relevante, especialmente, nos processos relacionados a excitotoxicidade neuronal e neurodegeneração em diferentes regiões do cérebro (Maiti *et al.*, 2008; Steinert *et al.*, 2010). O NO é uma molécula capaz de atuar como mensageiro retrógrado nos neurônios e, em altas concentrações, é responsável por liberar grandes quantidades de neurotransmissores glutamato durante o processo excitotóxico caracterizado por ativação de receptores NMDA extrasinápticos e influxo excessivo de íon Ca⁺², que leva a produção de espécies reativas e a ativa vias que culminam em morte neuronal (Lai *et al.*, 2013; Fujikawa *et al.*, 2015).

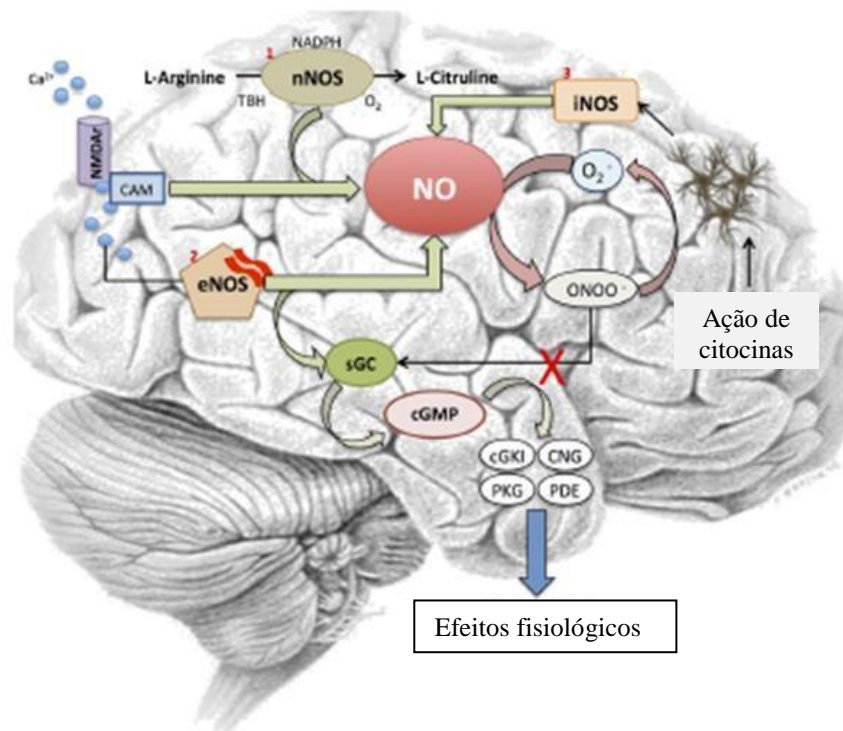


Figura 4: Implicações do Óxido Nítrico (NO) no Sistema Nervoso Central e efeitos associados a neurodegeneração. O aumento de NO observado em neuropatologias favorece a produção de espécies reativas nitrogenadas em virtude da associação dessa molécula com espécies reativas de oxigênio oriundas de células gliais ativadas, o que prejudica as funções fisiológicas e causa injúrias ao tecido. Extraído de Yuste *et al.*, 2015

Como já dito anteriormente, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas no curso da malária cerebral (Percário, 2012). O ânion superóxido (O_2^-), um intermediário de O_2 já citado anteriormente, pode reagir com NO e formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um intermediário altamente reativo e que causa vários efeitos deletérios ao organismo (Habib and Ali, 2011; Radi, 2013). Al Yaman e colaboradores (1996) mostraram que o aumento de intermediários reativos de nitrogênio está associado ao desenvolvimento da malária cerebral em humanos.

O peroxinitrito, assim como NO, é um radical difusível em membrana capaz de atuar sobre diversas biomoléculas e, com isso, interferir sobre vários sistemas fisiológicos do organismo (Pacher *et al.*, 2007 A). Alvos potenciais biológicos de peroxinitrito incluem membranas bem como receptores nucleares e citosólicos, o que acarreta distúrbios ligados à sinalização celular (Szabó *et al.*, 2007; Radi, 2013). A reação de radicais derivados de peroxinitrito, em especial, radicais hidroxila (OH) e dióxido de nitrogênio (NO_2), com lipídios leva à

peroxidação. A peroxidação lipídica pode auxiliar na oxidação e nitratação de proteínas tirosina em biomembranas e lipoproteínas (Radi, 2013). O peróxido de nitrito promove oxidação do ácido araquidônico e leva a formação de F2-isoprostanos a partir de lipoproteínas de baixa densidade. A nitratação de ácidos graxos pode conduzir à inibição da função de proteínas secundárias (Szabó *et al.*, 2007).

O peroxinitrito pode promover oxidação de co-fatores. De acordo com Dumitrescu e colaboradores (2007), esta molécula é capaz de aumentar a degradação oxidativa de BH₄, co-fator da óxido nítrico sintase (NOS), e causar o desacoplamento da enzima contribuindo para a disfunção endotelial e aumento de espécies reativas de oxigênio.

O peroxinitrito atua na mitocôndria se ligando irreversivelmente à componentes da cadeia transportadora de elétrons afetando sua atividade, o que acarreta acúmulo de espécies reativas de oxigênio e aumento do estresse mitoncondrial (Radi, 2013). Somado a isso, a nitratação do citocromo c aumenta a atividade peroxidase do mesmo, o que leva à geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e à exacerbação do dano oxidativo de proteínas mitocondriais (Hrabarova *et al.*, 2011). Além disso, pode promover a indução de apoptose via citocromo c, com lançamento de fatores pró-apoptóticos no citosol por oxidação de componentes de transição de permeabilidade de poros mitocondriais (Szabó *et al.*, 2007). Pino e colaboradores (2003) mostraram a relevância do peroxinitrito como uma das espécies reativas importantes para a indução de apoptose redox-dependente em células endoteliais humanas em virtude da infecção com *P. falciparum*.

O peroxinitrito pode ainda, promover danos ao DNA (Islam *et al.*, 2015). Essa molécula fortemente reativa age sobre nucleotídeos purinas e desoxirribose que são vulneráveis à oxidação e ocasiona ruptura na cadeia de filamentos. A nitratação ou oxidação de fragmentos de DNA gera 8-oxo e 8-nitroguanina (Szabó *et al.*, 2007; Hrabarova *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2015). Injúrias no DNA celular causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), inclusive peroxinitrito, induz apoptose também por regulação positiva da expressão de p53, que pode atuar sobre a expressão de enzimas pró-apoptóticas e o lançamento de citocromo c (Brown, 2010). Além disso, o acometimento do

material genético durante o estresse nitrosativo pode induzir à morte celular por necrose. Segundo Pacher e colaboradores (2007 B), danos severos no DNA exacerbam a ativação de PARP-1 e esgotam NAD⁺ e ATP na célula, dando início ao processo de morte por necrose. Além disso, recentes observações têm sido feitas sobre o papel de PARP-1 em induzir, também, a ativação de vias apoptóticas por liberação mitocondrial do fator de indução de apoptose (AIF- apoptosis-inducing factor) (Islam *et al.*, 2015).

1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS

A avaliação da patogênese da malária é um problema devido à escassez de dados patológicos e fisiológicos em humanos (Idro *et al.*, 2010). Estudos desse tipo, principalmente das síndromes graves, são limitados, uma vez que dependem de exames em amostras pós-mortem que nem sempre são acessíveis (Shikani *et al.*, 2012). Além disso, a análise dessas amostras não permite a avaliação da sequência de eventos que levam aos sintomas iniciais da malária cerebral ou a comparação dos casos fatais com aqueles que se resolvem em resposta ao tratamento (Souza *et al.*, 2009). Desse modo, os modelos experimentais em animais são muito importantes para a investigação da patogênese da doença, pois recapitulam muitas das características do que ocorre em humanos (Desruisseaux *et al.*, 2008)

Até agora, modelos experimentais de malária têm sido desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos e, apesar de certas limitações, representam fielmente certos aspectos da malária humana (Basir *et al.*, 2012).

O modelo murino é o mais amplamente utilizado nas pesquisas devido a questões éticas e de custo (Shikani *et al.*, 2012). Conforme mostra a tabela 1, neste modelo, as seguintes espécies são utilizadas: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium berghei*. Essas espécies são utilizadas por diferentes linhagens de camundongos de acordo com o que se deseja obter. (Matuschewski, 2013).

O modelo mais largamente utilizado de malária é a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 ou CBA (Basir *et al.*, 2012). Nas infecções mais graves como a malária cerebral, o modelo de

camundongos C57BL/6 infectado com PbA é o mais aceito (Craig *et al.*, 2012). Este modelo, frequentemente, referido como malária cerebral experimental (MCE), provoca nos camundongos vários sinais que definem a malária grave em seres humanos, incluindo a acidose metabólica, angústia respiratória aguda, disfunção hepática e danos neurológicos e comportamentais (Desruisseaux *et al.*, 2008; Cromer *et al.*, 2013). Ainda, neste modelo de MCE, observa-se pouco sequestro de hemácias parasitadas nos vasos do cérebro, onde se detecta, principalmente, leucócitos aderidos (Reis *et al.*, 2012; Cromer *et al.*, 2013). Essa é principal diferença observada entre a infecção humana e o modelo experimental, sabe-se que a maioria das células envolvidas no sequestro são leucócitos, notadamente macrófagos e células TCD8⁺ (Craig *et al.*, 2012). Esse sequestro também pode ser visto em outros órgãos, e existe o envolvimento de um processo inflamatório que se assemelha ao que ocorre nos pacientes com malária grave (Cromer *et al.*, 2013). No entanto, a relevância da resposta inflamatória para o desenvolvimento da doença em humanos e no modelo murino parece ser distinta e, enquanto a malária cerebral experimental é tida basicamente como uma síndrome inflamatória, a malária cerebral humana decorre, principalmente, em função da citoadêrencia de hemácias parasitadas e obstrução dos microvasos cerebrais (White *et al.*, 2010). Ainda assim, tem-se que o modelo de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, sendo o modelo experimental que mais se assemelha aos achados em pacientes, é de grande importância para a compreensão da patogênese da malária cerebral e suas sequelas e foi o modelo de escolha utilizado nesse estudo.

Espécies de <i>Plasmodium</i>	Cepas	Linhagem de camundongo	Características
<i>P.berghei</i>	NK65, ANKA ANKA	C57BL/6	Modelo robusto de vacina Síndromes de malária clínica
<i>P.yoelii</i>	17X	Balb/c	Modelo modesto de vacina
<i>P.chabaudi</i>	AS	A/J, DBA/2 C57BL/6	Susceptível a infecção sanguínea Resistente a infecção sanguínea
<i>P.vinckei</i>	vinckei	Balb/c	Infecções Letais

Tabela 1 Cepas de *Plasmodium sp.* que infectam diferentes linhagens de camundongos usadas em modelos murinos experimentais. Extraído de Matuschewski, 2013

1.4. DISFUNÇÃO COGNITIVA

A malária cerebral está associada com alta mortalidade e déficits neurocognitivos a longo prazo (Serghides *et al.*, 2011). Déficits neurológicos são observados, com frequência, em crianças doentes hospitalizadas, mas grande parte se resolve dentro de 6 meses (Boivin *et al.*, 2014). Recentes estudos sugerem que, após recuperação da doença, muitas dessas crianças sustentam lesões cerebrais graves, responsáveis por tais sequelas, e relatam a persistência dessas lesões por vários anos. (Idro *et al.*, 2010 B; Bungirana *et al.*, 2011). Segundo Idro e colaboradores (2010), aproximadamente, 25% dos infantes sobreviventes demonstraram perda cognitiva, de função motora ou danos comportamentais no período entre 6 meses a 9 anos após terem adquirido a doença. Com isso, o impacto da perda neurológica subsequente a infecções do sistema nervoso central pode ser devastador, acarretando dificuldades a nível social e econômico a seus portadores devido à redução de oportunidades de educação, trabalho ou mesmo em relacionamentos pessoais (Carter *et al.*, 2003; Oluwayemi *et al.*, 2013).

Estudos em modelos experimentais com *Plasmodium berghei* ANKA mostraram danos cerebrais em regiões importantes como fórnix, córtex e o hipocampo (Desruisseux *et al.*, 2008). O comprometimento dessas áreas cerebrais pode trazer prejuízos em todas as esferas cognitivas como déficits de linguagem, atenção, habilidades espaços visuais, funções executivas e perda de memória, a sequela persistente mais comum (Fernando *et al.*, 2010; Oluwayemi *et al.*, 2013).

Memórias podem ser divididas quanto ao seu conteúdo em dois grandes grupos: memórias declarativas (de eventos, fatos ou conhecimentos) ou memórias de procedimentos ou hábitos (andar de bicicleta, escrever em uma máquina, etc.). A memória declarativa, o que comumente chamamos de memória, está relacionada a capacidade de recordar ou reconhecer pessoas, objetos e lugares (Izquierdo *et al.*, 2013).

As memórias podem ser divididas, ainda, quanto a sua temporalidade em memórias de curta ou longa duração (Izquierdo, 2013). Esse tipo de divisão é particularmente válido para memórias do tipo declarativas, e faz referência a memória formada nas primeiras horas, logo após o aprendizado (memória de curta

duração) e à memória que demora horas para ser formada e é duradoura (memória de longa duração) (Izquierdo, 2008). Apesar de, a princípio, parecerem eventos subsequentes, recentemente estudos demonstraram que as memórias de curta e de longa duração ocorrem de maneira paralela, recrutando de forma independente as moléculas envolvidas no processo de formação e consolidação (Izquierdo, 2008; Izquierdo *et al.*, 2013).

O processo de formação de memória é caracterizado por uma sequência de eventos bioquímicos no hipocampo, que envolve a ativação de 3 diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, o AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-5-4- isoxazolpropiónico), o NMDA (N-metil-D-aspartato) e receptores metabotrópicos. Os receptores NMDA tem destaque por recrutarem, quando ativados, as proteínas envolvidas na sinalização que leva à formação de memória e aprendizagem (Sweatt, 2016). Esses receptores têm seu canal iônico bloqueado por ion Mg^{+2} quando estão inativos e só podem ser ativados na despolarização neuronal, que permite o deslocamento de Mg^{+2} e a abertura do canal iônico (Wang and Peng, 2016). A ativação de receptores AMPA permite a despolarização dos neurônios através do fluxo de íons Na^{+2} e K^{+} (Itoh *et al.*, 2016; Wang and Peng, 2016).

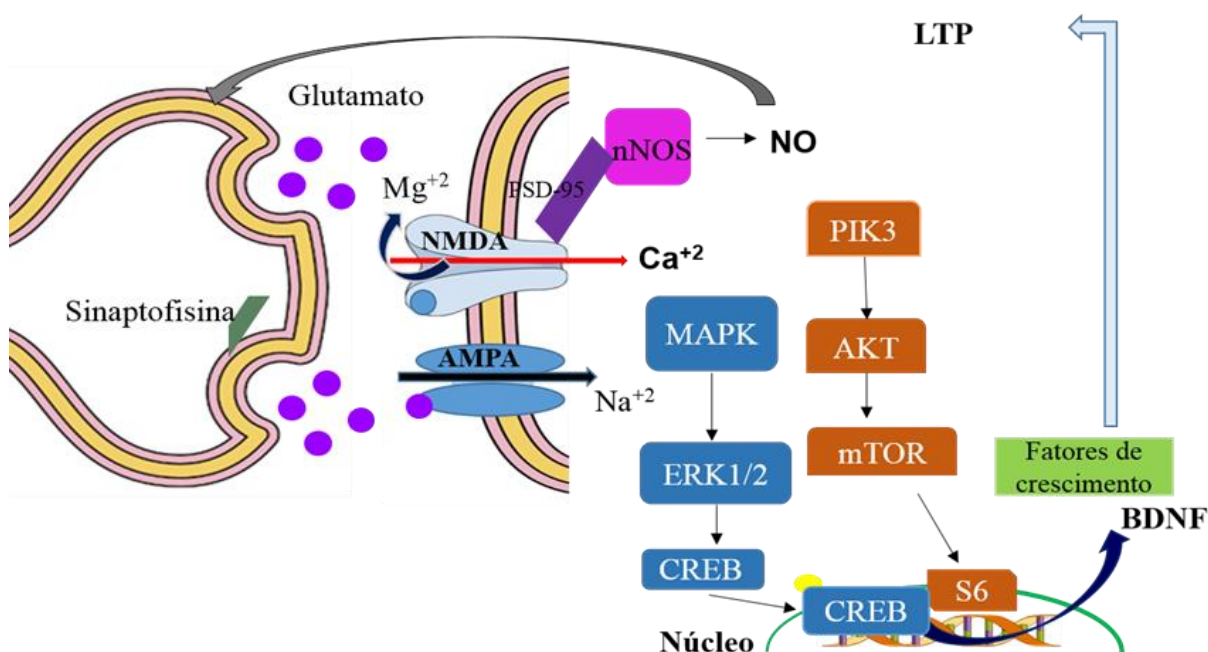


Figura 5: **Via de sinalização glutamatérgica disparada no processo de formação e consolidação de memória.** A ativação de receptores glutamatérgicos permite a ativação de uma

cascatas de sinalização que leva a produção de fatores de crescimento associados a formação de potenciais de longa-duração (LTP). Igreja-Silva, T.

Com a ativação dos receptores NMDA ocorre a entrada de Ca^{+2} e a consequente ativação de cascatas bioquímicas que irão promover a ativação de proteínas quinase (PKA, PKC, PKG e CAMKII) e induzir um aumento na expressão de fatores de transcrição importantes para a síntese de proteínas envolvidas na plasticidade neuronal e na formação e consolidação de memória (Izquierdo and Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 2008). A ativação das vias das MAPK e PI3K/AKT levam à produção de CREB e S6, fatores de transcrição que uma vez ativados por proteínas quinase se direcionam ao núcleo e induzem a produção de neurotrofinas que vão estimular a formação de potenciais de longa duração (LTP), relacionados ao processo de formação e consolidação de memória (Figura 5) (Katche *et al.*, 2013). Ainda, a ativação dessa via induz a produção de NO por ativação de nNOS, um importante mensageiro retrógrado produzido pós-sinápticamente e que atua no terminal pré-sináptico favorecendo a liberação de neurotransmissores, o que induz a manutenção dos LTP e a sustentação de sinapses, um evento importante para a plasticidade sináptica e a consolidação de memória (O'Dell *et al.*, 1991; Zhuo *et al.*, 1998).

Durante a ativação da via acima descrita, o fator neurotrófico BDNF (brain-derived neurotrophic factor) é uma das principais proteínas produzidas e atua tanto na formação de memórias, como também horas mais tarde na determinação se as memórias consolidadas persistirão por poucos dias ou por semanas (Izquierdo *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2016). Esta molécula é particularmente importante na formação de memória de longa duração e diversos trabalhos já demonstraram que reduções nos níveis fisiológicos de BDNF estão associadas às disfunções cognitivas observadas em desordens neuropatológicas, inclusive no modelo experimental de malária cerebral (Wang and Peng, 2016; Wang *et al.*, 2016; Comim *et al.*, 2012).

Os potenciais de longa duração (LTP) consistem no aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetitiva de um axônio ou de um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (Sweatt, 2016). Muitos estudos têm sido realizados sobre a base molecular dos LTP na região

CA1 do hipocampo para o processo de formação de memória (Izquierdo, 2008; Sweatt, 2016). O hipocampo é a principal estrutura envolvida no processo de formação de memória (Izquierdo and Medina, 1997). O aumento das respostas pós-sinápticas por horas, dias ou semanas parece indicar a importância de LTP na formação e armazenamento de memórias de longa duração (Izquierdo *et al.*, 2008). Para isso, a região CA1 se conecta com outras regiões cerebrais, enviando fibras excitatórias a uma região chamada subículo, que emite novas fibras para o córtex entorrinal, que emite axônios para o giro denteado, que projeta para outra região hipocampal denominada CA3, cujos axônios fazem sinapses excitatórias com células piramidais de CA1, completando o chamado sistema hipocampal (Figura 6) (Izquierdo, 2008). Segundo Wu *et al.*, 2013, déficits nas transmissões sinápticas do sistema hipocampal, em especial nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, podem acarretar perdas cognitivas.

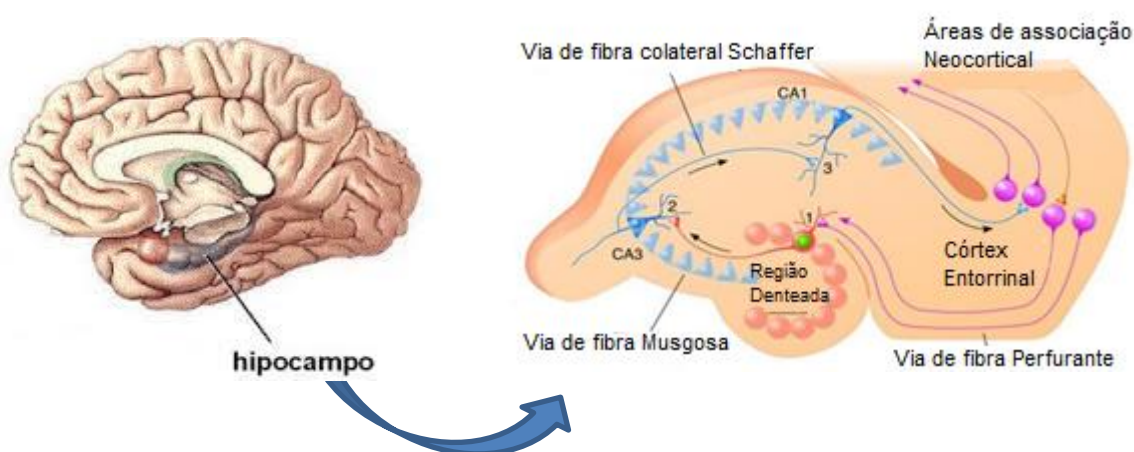


Figura 6: Circuito nervoso hipocampal relacionado ao processo de formação e consolidação de memória. Extraído de <https://netnature.files.wordpress.com/2011/02/hipocampus.jpg>

Reis e colaboradores (2010) mostraram que na malária cerebral experimental, camundongos C57BL/6 infectados com PbA sofrem perda de memória. O mesmo grupo mostrou que a produção de espécies reativas está envolvida no processo. O aumento de espécies reativas na patologia do SNC pode interferir na transmissão colinérgica, crucial para formação de memória, e, além disso, levar a degeneração neuroglial por serem importantes indutores de apoptose

celular (Wiese *et al.*, 2006; Tabrizian *et al.*, 2011, Isah and Ibrahim, 2014). Estresse oxidativo induzido por hipóxia-hipobárica afeta diferentes áreas cerebrais, incluindo córtex e hipocampo que, como foi visto anteriormente, têm importante papel nos processos de formação e consolidação de memória (Maiti *et al.*, 2008).

Além do que já foi citado, complicações cognitivas têm sido relacionadas, também, com ativação de microglias e astrócitos em regiões cerebrais associadas à cognição. Estas células auxiliam a reposta inflamatória periférica e secretam fatores pró-inflamatórios, bem como produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Tronel *et al.*, 2013). Segundo Reis e colaboradores (2012), intervenções no avanço neuroinflamatório observado durante a malária cerebral experimental podem atuar na prevenção de dano cognitivo associado a doença. Esse processo contribui com as injúrias teciduais observadas e com o processo neurodegenerativo caracterizado por rupturas sinápticas, o que vai acarretar a formação da seqüela cognitiva.

No presente trabalho, buscamos avaliar a contribuição de níveis nitrérgicos elevados frente aos eventos acima citados e às disfunções cognitivas estabelecidas, tendo como alvo a enzima iNOS.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo geral avaliar o papel da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na patogênese da malária cerebral e sequelas cognitivas associadas.

2.2 Objetivos específicos:

A partir do uso de camundongos *knockouts* para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e do tratamento com aminoguanidina, um inibidor farmacológico seletivo para iNOS, objetivou-se avaliar durante o modelo experimental de malária cerebral:

- A formação de disfunções cognitivas;
- A caracterização da patologia:
 - expressão de moléculas de adesão;
 - produção de citocinas pró-inflamatórias;
 - atividade de mieloperoxidase (MPO);
 - produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
- A ativação de microglia, indicador de neuroinflamação;
- A indução de morte neuronal

3. METODOLOGIA

3.1 Animais:

Para os ensaios de malária cerebral experimental foram utilizados camundongos machos de linhagem C57BL/6, *wild-type* e *knockouts* iNOS (n=6-12/grupo) com peso de 18 a 20 gramas, fornecidos pelo CECAL, Biotério Central da FIOCRUZ, licença CEUA-L015/15. Paralelamente, camundongos C57BL/6 foram utilizados para uma abordagem farmacológica de bloqueio da enzima iNOS. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, do Instituto Oswaldo Cruz. Os mesmos foram alocados em gaiolas plásticas de microisoladores ventilados, a temperatura ambiente, com livre acesso à ração e água e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

3.2 Manutenção e Infecção:

Cepas de *Plasmodium beghei* ANKA (PbA) foram mantidas através da coleta de sangue de animais doadores com aproximadamente 10% de parasitemia e congeladas em nitrogênio líquido, após centrifugação e substituição do plasma pela solução de congelamento. O sangue coletado é centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para separar as hemácias do plasma que é substituído por uma solução tamponada de glicerolito para que o sangue possa ser congelado. Para os experimentos, sangue coletado de camundongos passagem com 10% de parasitemia foi utilizado na infecção do grupo experimental. Camundongos *wild-type* e *knockouts* iNOS ou tratados ou não com inibidor farmacológico de iNOS, aminoguanidina, foram inoculados com 10^6 hemácias parasitadas. Como controle, animais receberam 10^6 hemácias não parasitadas.

3.3 Parasitemia e Sobrevida

Para a avaliação da parasitemia foi feito um pequeno corte na ponta do rabo dos camundongos para a coleta de uma gota de sangue, no 6º dia de infecção. O sangue foi colocado em lâminas para a confecção de esfregaços sanguíneos, posteriormente, corados por Método Panótico Rápido. As lâminas coradas foram levadas a um microscópio óptico sob óleo de imersão em aumento de 1000 x para a contagem da parasitemia dos animais. A parasitemia dos animais foi avaliada no

6º dia pós-infecção. A mortalidade foi observada todos os dias a partir da infecção e até que todos os animais morressem.

3.4 Escore Clínico de avaliação de gravidade da doença

No sexto dia de infecção os camundongos começam a apresentar sinais clínicos que são indicadores de gravidade da doença. A malária grave, como dito anteriormente, se caracteriza por diversas disfunções tais como: anemia grave, acidose metabólica, estresse respiratório e malária cerebral (Rénia *et al.*, 2012). Dezoito critérios associados a malária grave são analisados por animal: pilereção, interesse pelo ambiente, andar vacilante, corpo arqueado, paralisia de pata, coma, convulsões, respiração alterada, cor da pele, batimento cardíaco alterado, fechamento de pálpebras, lacrimação, escape ao toque, força ao agarrar, alteração de temperatura, tônus dos membros, tônus do abdômen e tônus corporal. Os animais infectados são avaliados de modo a se constatar ou não a presença dessas alterações. O controle também é colocado em teste de modo a confirmar a ausência de interferências externas no experimento. O animal recebe escore 1 ou 0, de acordo com a presença ou não de cada uma das alterações acima descritas. O escore total de cada animal é feito, então, a partir da soma das alterações encontradas, de modo que, a observação de quatro ou mais alterações indicam o estabelecimento de um quadro mais grave com possível comprometimento neurológico (Reis *et al.*, 2012).

3.5 Drogas administradas

Os animais submetidos a inibição farmacológica da enzima iNOS, foram tratados com aminoguanidina (SIGMA-ALDRICH, Brasil) (100 mg/kg p.c, 200µL, via intraperitoneal diluída em NaCl 0,9%) do 3º ao 6º dia de infecção.

Animais direcionados às avaliações cognitivas no 15º dia de infecção, receberam antimalárico cloroquina (SIGMA-ALDRICH, Brasil) (25 mg/kg p.c., 200 µL, via oral diluída em NaCl 0,9%) durante 7 dias, a partir do 6º dia de infecção para controle e prevenção da mortalidade por níveis elevados de parasitemia.

3.6 Testes Comportamentais

3.6.1 Esquiva Inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado visando avaliação de danos na capacidade cognitiva associada a memória aversiva. Na sessão de treino, os animais são colocados sobre a plataforma da caixa de esquiva passiva (Insight Equipamentos LTDA) e é verificado o tempo que o animal leva para descer (tempo de latência). Imediatamente após a descida, o animal recebe um choque de 0,6 mA durante 3 segundos. Na sessão de teste, o animal é novamente colocado na plataforma e tem seu tempo de descida (latência) aferido, porém sem administração do choque. Os intervalos entre o treino e o teste são de 90 minutos para avaliar memória de curta duração e 24 horas para memória de longa duração (Reis *et al.*, 2012).

3.6.2 Freezing

O teste freezing foi realizado, similarmente ao esquiva, com o objetivo de avaliar danos na capacidade cognitiva associado à resposta ao medo condicionado (Soya *et al.*, 2013). 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 (Reis *et al.*, 2017).

3.6.3 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 (Reis *et al.*, 2017).

3.7 Coleta de amostras

3.7.1 - Sangue

Os camundongos C57BL/6, *knockouts* ou não, foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano e as amostras de sangue foram coletadas por via ocular, desprezando-se o sangue em eppendorfs. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm em centrífuga clínica por 10 minutos. O soro foi coletado e estocado no freezer -80°C.

3.7.2 – Cérebros

Posteriormente à coleta de sangue, foi realizada a perfusão dos animais em estudo com solução salina (NaCl 0,9 %) e, após a lavagem de todo o sangue, foi feita a abertura do crânio para a remoção do cérebro dos animais. Estes cérebros foram coletados e armazenados em freezer -80°C.

3.8. Dosagem de proteínas pelo método do BCA

Amostras cerebrais foram extraídas após a perfusão dos animais e homogeneizados em tampão apropriado para cada análise. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método BCA (Pierce, Thermo Scientific, EUA).

O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2 mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante.

As amostras totais homogeneizadas foram diluídas 10 x numa solução de PBS contendo BHT (hidroxitolueno butilado - *butylated hydroxytoluene*) (0,2 %), de modo que 10 µL de cada amostra foi adicionado em 90 µL de PBS/BHT. Feito isso, 10µL das amostras previamente diluídas foram adicionados em placas 96 poços de fundo chato e, posteriormente, adicionados 190 µL do reagente de

trabalho descrito acima. A placa foi incubada em estufa a 37°C por trinta minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

3.9. Testes de avaliação do estresse oxidativo

3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para caracterização do estresse oxidativo no cérebro dos camundongos C57BL/6 knockouts iNOS quantificamos a peroxidação lipídica pela reação ao ácido tiobarbitúrico - TBARS. Os cérebros animais C57BL/6 wild-type e iNOS^{-/-} foram homogeneizados em PBS (NaCl 1,37M; KH₂PO₄ 0,018 M; Na₂HPO₄ 0,1M; KCl 0,027 M; pH 7,4), contendo 0,2% de BHT (hidroxitolueno butilado-*butylated hydroxytoluene*). Foi realizada quantificação de proteína (diluição 10x - 10 µL da amostra/ 90 µL de PBS) pelo kit de ensaio de proteína BCA da Pierce (Thermo Scientific, EUA) conforme descrito anteriormente. Após a quantificação de proteína foram feitos cálculos do quanto de cada amostra seria utilizada por cada 50 µg de proteína. As amostras foram diluídas em PBS-BHT totalizando (0,5 mL) e foram misturados com igual volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67% (Sigma Chemical, EUA). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100° C durante 60 min. As amostras foram colocados no gelo para a parada da reação. Foram aplicados 200 µL da solução em placas de 96 poços de fundo chato e a absorvância foi determinada em 535 nm na leitora de microplaca. Os resultados foram expressos como malondialdeído (MDA, $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9.2 Dosagem de grupamentos tióis totais (Teste de Glutathiona Reduzida)

A avaliação da presença de grupos tióis foi mais uma análise escolhida para quantificação do estresse oxidativo em camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-}. O método se baseia na determinação de grupos sulfidrilas totais, que representam todos os grupos tióis encontrados em proteínas e compostos de baixo peso molecular, e podem ser oxidados dado o aumento na concentração de espécies reativas. Os grupos tióis reagem com DTNB, reagente de Ellman, formando um complexo que pode ser lido a 412 nm.

As amostras cerebrais, previamente homogeneizadas em PBS+BHT 0,2%, de animais C57BL6 *wild-type* e iNOS^{-/-} foram diluídas em TCA 10% em um

volume de 1:1. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, de modo a separar o sobrenadante. Por último, 75 µL do sobrenadante foi colocado junto a 300 µL de Tris-HCL e 30µL do DTNB para reagir por 30 minutos.

Após a reação, 200µL de cada amostra foi plaqueado em placas de 96 poços com fundo chato e lidos por espectrofotômetro a 412 nm. O cálculo é feito utilizando-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) = 14200 M⁻¹cm⁻¹.

3.10 Análise de atividade de mieloperoxidase (MPO) cerebral

A mieloperoxidase parece estar associada ao estresse oxidativo observado em algumas patogenias, tendo sido avaliada sua atividade. Para isso, metade dos cérebros extraídos pós-perfusão foi pesado com o fim de preparação da solução de homogeneização (PBS-EDTA 5 µM + Brometo de cetildimetilamônio 0,5% (HTAB)). As amostras foram homogeneizadas seguindo a proporção de 100 µL de solução para cada 50 mg de tecido. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C por 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante das amostras foi separado e, então, recentrifugado por 1200 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi coletado e colocado junto aos reagentes em placa de fundo curvo para reagirem por 30 minutos à 37°C. Retirou-se 50 µL do sobrenadante de cada amostra que foi adicionado à 50 µL da solução de homogeneização e 50 µL de solução de o-dianisidina (0,68 mg/mL), sendo incubados por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - 0,006%) à reação que perdurou por mais 10 minutos. Transferiu-se 200 µL para uma placa com fundo chato para a leitura das amostras em espectrofotômetro a 460 nm. O cálculo foi realizado a partir do valor da absorvância/peso das amostras cerebrais.

3.11 Dosagem de citocinas através do ensaio imunoabsorção ligado à Enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Para avaliar a resposta inflamatória através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, foram dosados os níveis de TNF- α e INF- γ em amostras de soro de camundongos iNOS^{-/-} ou não através do *kit* R&D dual set.

Placas de fundo chato para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura diluído em PBS (50 µL/poço) e seladas com filme

plástico. Após incubação por 16 horas a 4°C, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem constituído de PBS 1 acrescido com Tween® 0,05% (100µL/poço) e incubadas durante uma hora com a tampão de bloqueio constituído de PBS acrescido com 1% de albumina sérica bovina-BSA (100 µL/poço) (Sigma Aldrich). A curva padrão foi diluída em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) e aplicada na placa, bem como as amostras (50 µL/poço). Após nova incubação por 16 horas a 4°C as placas foram lavadas 4x com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio + Tween® (0,05%) (50 µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 6x com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (R&D dual set) (50 µL/poço). Trinta minutos após a incubação no escuro, as placas foram lavadas 8x com tampão de lavagem e foi acrescida a solução de 3,3_,5,5_-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi interrompida com solução de H₂SO₄ 0,4N (50 µL/poço) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas.

3.12. Western Blotting

As amostras cerebrais coletadas foram divididas em regiões de interesse: córtex e hipocampo. Estas amostras foram maceradas em tampão de lise RIPPA (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) segundo o esquema abaixo:

Amostras de córtex	1mL de RIPPA
Amostras de hipocampo	300 µL de RIPPA

As amostras maceradas foram sonicadas e, posteriormente, centrifugadas para a obtenção do sobrenadante com as proteínas a serem analisadas. O sobrenadante coletado foi submetido à quantificação de proteínas, segundo o método de quantificação pelo kit BCA (descrito anteriormente). Após esta etapa, as amostras foram preparadas em tampão de amostra 1:1 de modo que a concentração final de proteínas em cada poço do gel fosse igual a 50 µg/ 15µl

(7,5 µL de amostra diluída em RPPA + 7,5 µL 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 µl do padrão de peso molecular (*RAINBOW Odyssey system™* - Li-Cor, Biociences). Em seguida, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese (em gel de acrilamida 4-20%, *Mini-Protean TGX precast Gels®*-BioRad) 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) previamente permeabilizada em metanol 100%, utilizando tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 190 mM; pH 8,3) metanol 20 %. A transferência foi realizada a 45 V por 90 minutos em sistema semi-seco (Amersham Biosciences). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora preparada com BSA (Albumina Sérica Bovina – *Bovin Serum Albumin*) a 5% diluída em TBS (Tris 10mM; NaCl 150Mm; pH 8,0) 0,05% Tween®. Posteriormente, a mesma foi incubada *overnight*, protegida da luz, com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio e TBS Tween® 1:1. Para avaliação da morte celular, foi utilizado o anticorpo primário *rabbit* anti-caspase-3 (1:1000, Abcam) e para normalização foi utilizado o anticorpo primário *goat* anti-actina (1:10000, Abcam). As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana por meia hora, com os anticorpos secundários (*anti-rabbit* e *anti-mouse* - 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®*.

3.13. Quantificação da expressão de mRNA

Amostras cerebrais recolhidas foram fragmentadas e armazenadas em tubos livre de RNase (Axygen) com 1000 µL de reagente Trizol® (Invitrogen) a -20°C. Todo o procedimento foi feito seguindo as recomendações do reagente Trizol® Reagent (Invitrogen). Para a extração e purificação do RNA, foi adicionado 200 µL de clorofórmio às amostras. Com auxílio do vórtex, as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e posteriormente e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado

500 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e depois foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75 % e centrifugado a 12000 g por 5 minutos a 4°C. Esperou-se o álcool evaporar em temperatura ambiente na capela por 5-10 minutos. O RNA foi resuspenso em 20 µL de água livre de RNase (água DEPC). O RNA foi quantificado através da utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C para uso posterior.

3.13.1. Transcrição reversa do RNA (RT)

O cDNA foi sintetizado utilizando kit específico (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen). Para isso, 1 µg de cada amostra de RNA foi misturado com 1 µL de dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate) a 10 mM, 1 µL de primer oligodT (Invitrogen, 0,5 µg/µL), e completado com água (livre de RNase) até 10 µL. Esta mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e resfriada em gelo por 1 minuto. Em seguida, adicionaram-se em cada tubo os seguintes reagentes: 2 µL de RT buffer 10x, 4 µL de MgCl₂ a 25 mM e 2 µL de DTT a 0,1 M. Os tubos foram aquecidos a 65°C por 5 minutos e resfriados em gelo por 1 minuto. Logo após, adicionou-se 1 µL de enzima SuperScript II RT (Invitrogen, 50 U/µL) em cada tubo e as amostras foram aquecidas a 42°C por 50 minutos e depois a 70°C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 1 µL de RNase H (2 U/µL) por tubo, que foram em seguida, incubados por 30 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -20°C.

3.13.2 Reação em cadeia de polimerase qualitativo (PCR- RT)

As amostras de cDNA foram incubados em um mix com 6 µL de Platinum PCR Supermix (Invitrogen), 0,2 µL de primer *forward* e 0,2 µL de primer *reverse* e 1,6 µL água livre de RNase (água DEPC). Adicionamos 2µL de cDNA ao mix preparado, completando um volume total de 10 µL do preparado em cada tubo. Com isso, foi realizada a amplificação do cDNA através de PCR usando o aparelho ProFlex PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). A reação é feita em 35 ciclos. Após um passo de desnaturação inicial a 95° C durante 15 min, iniciou-se o ciclo de temperatura. Cada ciclo consistia em desnaturação a 94 ° C durante 3

0 segundos, recozimento a 60 ° C durante 30 segundos, e alongamento a 72 ° C durante 30 segundos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (600 mg diluídos em 30 mL de TBE (Tris-base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,5 M; pH 8,0) submetidos a uma voltagem de 120 V e foram analisados através da marcação com SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies). Após 30 minutos de corrida, o gel foi submetido a captura de imagens através do aparelho E-Gel Imager (Life Technologies). Essas imagens foram analisadas por ImageJ software.

3.13.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativo (q PCR Real Time)

Antes de iniciar o PCR, foi feito um sub-estoque do *primer* de interesse na concentração de 10⁵nM. Os transcritos foram preparados para a reação através da seguinte mistura: 10µL *Power SYBR-green*; 0,6µL de *primer forward* e *reverse*; 7,8µL de água DEPC; e 1µL de cDNA. A amplificação foi realizada no aparelho de PCR em tempo real StepOne Applied Biosystems. Os primers utilizados foram: ICAM-1, iNOS, TNF-α, GAPDH e HPRT. A expressão dos níveis de RNA foi calculada através do programa de software do aparelho *StepOne software* e normalizadas em relação aos níveis de expressão dos genes constitutivos *HPRT* ou *GAPDH*.

Sequência de Primers: ICAM Left Primer (AGC ACC TCC CCA CCT ACT TT); ICAM Right Primer (AGC TTG CAC GAC CCT TCT AA); iNOS Left Primer (CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT); iNOS Right Primer (ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC); TNF Left Primer (AGC CCC CAG TCT GTA TCC TT); TNF Right Primer (CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG). HPRT Left primer (agg acc tct cga agt gtt gg) / Right primer (agg acc tct cga agt gtt gg); GAPDH Left primer (agg acc tct cga agt gtt gg) / Right primer (ttg cag att caa ctt gcg ct).

3.14. Imunohistoquímica

Amostras cerebrais coletadas no 6º dia de infecção foram perfundidas com solução salina e imediatamente armazenados em solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS durante três dias, seguido de solução crioprotetora de sacarose 20% em PBS por dois dias a 4°C. Os cérebros foram então congelados em gelo seco pulverizado e cortes coronais de 40 µm foram obtidos em criostato.

As fatias de tecido foram obtidas de maneira sistemática e armazenadas em placas de 24 poços em PBS + azida 0,2% a 4°C de maneira que fatias de regiões cerebrais equivalentes de cada animal foram utilizadas em cada imunohistoquímica. As fatias foram lavadas em PBS e tratadas com Sudan Black B (0,1% em etanol 70%) por 30 minutos para a eliminação da autofluorescência tecidual. As fatias foram incubadas com tampão de bloqueio (soro normal de cabra 5%, albumina de soro bovino 3% em solução de tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100) por uma hora à temperatura ambiente em agitação leve e constante. Os cortes foram incubados com anticorpo primário em tampão de bloqueio, e deixados em agitação *overnight*. Para marcação de microglia, o anticorpo primário utilizado foi o coelho anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) (1:400, Wako Chemicals. Após serem lavadas em PBS, as seções foram incubadas com anticorpo secundário de cabra Alexa 488 anti-igG de coelho (1:1000) em tampão de bloqueio por duas horas. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS e montados em lâminas com meio de montagem (Vectashield) com DAPI. As fatias foram fotografadas em microscópio de fluorescência (objetiva 20x) e em microscópio confocal (objetiva 63x). A análise foi realizada nas regiões CA1 do hipocampo com auxílio do programa ImageJ

3.15. Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas de média, desvio-padrão, erro padrão da média (variação interquartil, quando aplicável). Para análise da mortalidade foi utilizado o teste Log-Rank-Mantel Cox. Dados de parasitemia, escore clínico, esquiva inibitória, labirinto aquático de Morris, ativação da micróglia foi utilizado o teste T de Student. Dados do modelo de freezing, análise de citocinas, estresse oxidativo, atividade de MPO, e para o rt-PCR foram feitas por ANOVA seguido do teste de Tukey. Em todas as análises, foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ ou menos.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação de mortalidade e parasitemia em camundongos *iNOS*^{-/-} susceptíveis a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA

Na figura 7A observamos o gráfico correspondente a curva de mortalidade comparativa entre camundongos *wild-type* e *iNOS*^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Não houve diferença significativa de mortalidade entre os grupos estudados. A figura 7B mostra a parasitemia dos grupos no 6º dia após a infecção, em que são descritos os picos de parasitemia, onde observamos que não há diferença estatística no percentual de parasitemia entre os grupos estudados.

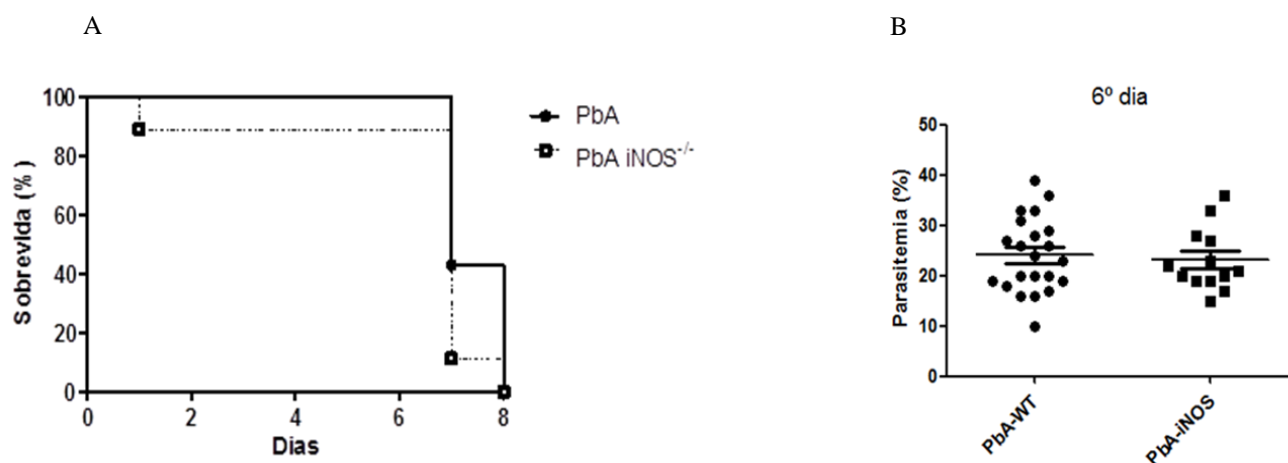


Figura 7 - Avaliação de curva de mortalidade e parasitemia de camundongos C57BL/6 *wild-type* e *iNOS*^{-/-}. 7A-Avaliação da mortalidade entre camundongo infectados *iNOS*^{-/-} (n=6-10/grupo) em comparação com infectados *wild-type* no sexto dia pós-infecção. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste Log-rank Mantel-Cox). 7B-Parasitemia de camundongos C7/Bl6 *iNOS*^{-/-} (n=6-10/grupo, repetição de 3 experimentos) comparada com camundongos *wild-type* durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste T de Student.

4.2 Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 *iNOS*^{-/-} no modelo de malária cerebral experimental

A figura 8 mostra o resultado de escore obtido de animais $iNOS^{-/-}$ e *wild-type* infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. As análises de dano neurológico foram feitas a partir de sinais indicadores de malária grave, segundo parâmetros baseados no protocolo SHIRPA (Reis *et al.*, 2012), no sexto dia pós-infecção. Podemos observar no gráfico abaixo que camundongos $iNOS^{-/-}$ infectados apresentaram um escore clínico significativamente mais baixo se comparados ao seu controle infectado e abaixo do limiar correspondente ao desenvolvimento de malária grave.

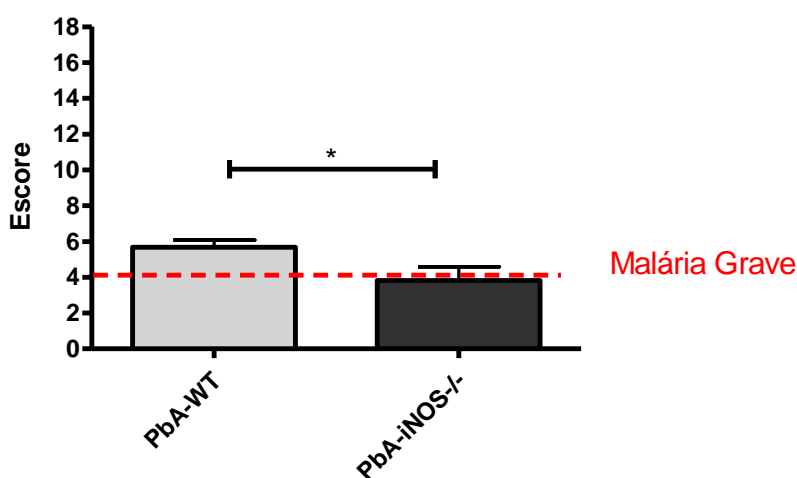


Figura 8 - Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 *wild-type* e $iNOS^{-/-}$. O estabelecimento de malária cerebral com detecção dos sintomas relacionados foi aferido em $iNOS^{-/-}$ (n=6-10/grupo; repetição de 3 experimentos) no sexto dia pós-infecção. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ pelo teste T de Student

4.3 Avaliação cognitiva de camundongos C57BL/6 $iNOS^{-/-}$ durante a malária cerebral experimental

As figuras abaixo (Figuras 9, 10 e 11) mostram a capacidade cognitiva de animais *wild-type* e $iNOS^{-/-}$ sadios ou recuperados da infecção com PbA pelo tratamento com o antimalárico cloroquina. As Figura 9 e 10 mostram a avaliação de formação e consolidação de memória aversiva pelos testes de esquia inibitória (9A e 9B) e freezing (10).

Nas Figuras 9A e 9B, são observadas as análises de memória de curta e longa duração, respectivamente, pelo teste de esquia inibitória. Em ambos os

casos, camundongos *wild-type* infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentaram menor tempo de latência na plataforma (* $p < 0,05$ teste T) se comparados ao seu controle não-infectado e, portanto, desenvolvem dano cognitivo. Em contrapartida, camundongos *iNOS*^{-/-} recuperados da infecção por tratamento com cloroquina demonstraram não sofrer perda de memória, com tempo de latência (* $p < 0,05$ teste T) na plataforma similar ao controle não-infectado.

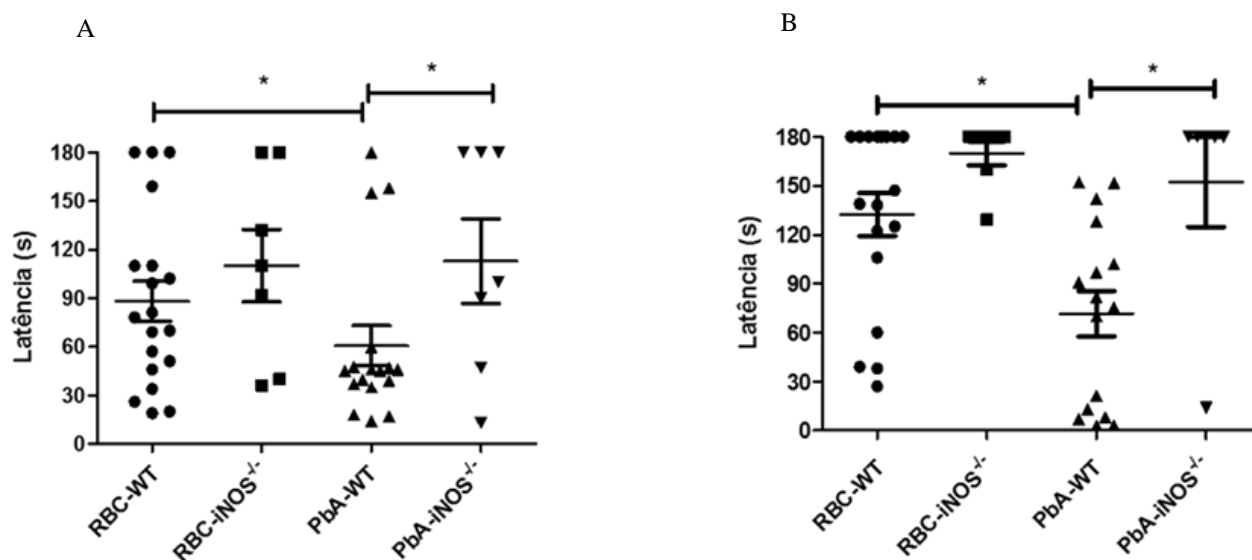


Figura 9 – 9A e 9B - Avaliação de dano cognitivo camundongos *iNOS*^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei* ANKA pelo teste esquiiva inibitória. Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo; repetição de 2 experimentos), *iNOS*^{-/-} e *wild-type*, foram infectados com 10⁶ PRBC com *P. berghei* ANKA. Após serem avaliados pelo escore clínico, o tratamento com cloroquina (25 mg/kg p.c. por v.o.) foi iniciado (dia 6 após a infecção), perdurando por 7 dias. No 15º dia, durante a sessão treino os animais receberam um choque de 0.6 mA (3 s) imediatamente após descerem a plataforma. 1h e 30 min (9A) e 24 horas (9B) após o treino foi avaliada a possível formação de dano cognitivo representado pelo tempo de latência dos animais na plataforma * $p < 0,05$ pelo teste T de Student (A - 1,5 h – Memória de curta duração e B 24 horas- Memória de longa duração).

Na Figura 10, observamos as análises obtidas pelo teste de freezing, realizado como forma de corroborar os resultados já obtidos pelo teste de esquiiva inibitória. Nesse teste, camundongos *wild-type* infectados com PbA também apresentaram desenvolvimento do dano cognitivo, mostrando menor tempo de freezing (* $p < 0,05$ teste de Turkey) quando comparados ao controle não infectado. Camundongos *iNOS*^{-/-} infectados não apresentaram perda de memória pelo teste

freezing, o que parece significar que a ausência da produção de NO via iNOS oferece proteção quanto a formação de dano cognitivo.

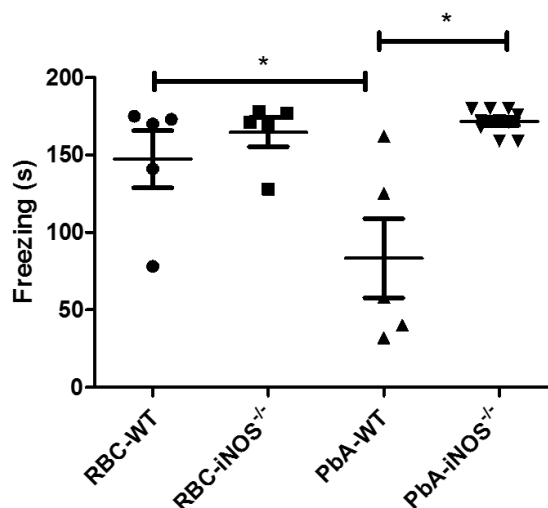


Figura 10 - Avaliação de dano cognitivo camundongos iNOS^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei ANKA* pelo teste freezing. Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo), iNOS^{-/-} e *wild-type*, foram infectados com 10⁶ PRBC com *P. berghei ANKA* e tratados do dia 6 ao 12 pós-infecção com cloroquina (25 mg/kg p.c. v.o). No 15º dia durante a sessão treino os animais receberam um choque de 0.6 mA (3 s) 3 minutos após serem colocados na caixa e outro 30s após o primeiro. Após 24 horas (teste) foi avaliada a possível formação de dano cognitivo representado pelo tempo de movimento dos animais na caixa de avaliação. * p<0,05 pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

A Figura 11 mostra o resultado relacionado a capacidade de aprendizado de camundongos wild-type e iNOS^{-/-}, infectados ou não, pelo teste cognitivo Labirinto de Morris (Water maze). É observado que camundongos *wild-type* submetidos à infecção com PbA têm um comprometimento da sua capacidade de aprendizado. No entanto, o resultado mostra que camundongos iNOS^{-/-} têm desempenho similar ao controle não-infectado e não apresentam a perda dessa capacidade, sugerindo, novamente, que a ausência da enzima iNOS confere proteção quanto às funções cognitivas durante a infecção

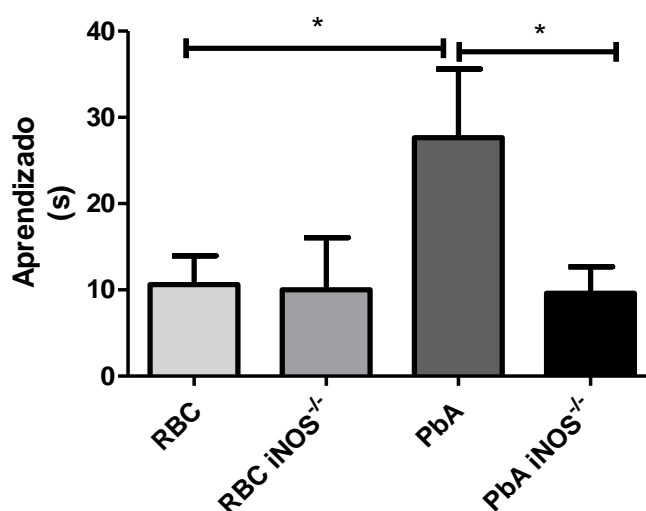


Figura 11 - Avaliação da capacidade de aprendizado de camundongos iNOS^{-/-} durante a malária cerebral experimental através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze). Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo), iNOS^{-/-} e *wild-type*, foram infectados com 10⁶ PRBC com *P. berghei ANKA* e tratados do dia 6 ao 12 pós-infecção com cloroquina (25 mg/kg p.c. v.o). No 15^o dia, os animais foram colocados em uma piscina com uma plataforma submersa e foram treinados a aprenderem o labirinto até a plataforma. Foram realizadas três sessões treinos no mesmo dia. Após 24 horas foi avaliado o aprendizado dos animais baseado no tempo de deslocamento até a plataforma. * p<0,05 pelo teste T de Student.

4.4 Avaliação da expressão de iNOS em camundongos iNOS^{-/-} durante a malária cerebral experimental

O resultado abaixo (Figura 12) mostra as variações observadas na expressão da enzima iNOS, que são comuns durante desafios infecciosos. O gráfico mostra que, durante a infecção por *Plasmodium berghei ANKA*, existe aumento significativo da expressão de mRNA da enzima iNOS em amostras de hipocampo coletadas no 6 dia após a infecção. Ainda, na Figura 12, como esperado, os animais iNOS^{-/-} apresentaram níveis considerados nulos para essa enzima, o que confere confiabilidade aos estudos realizados neste projeto.

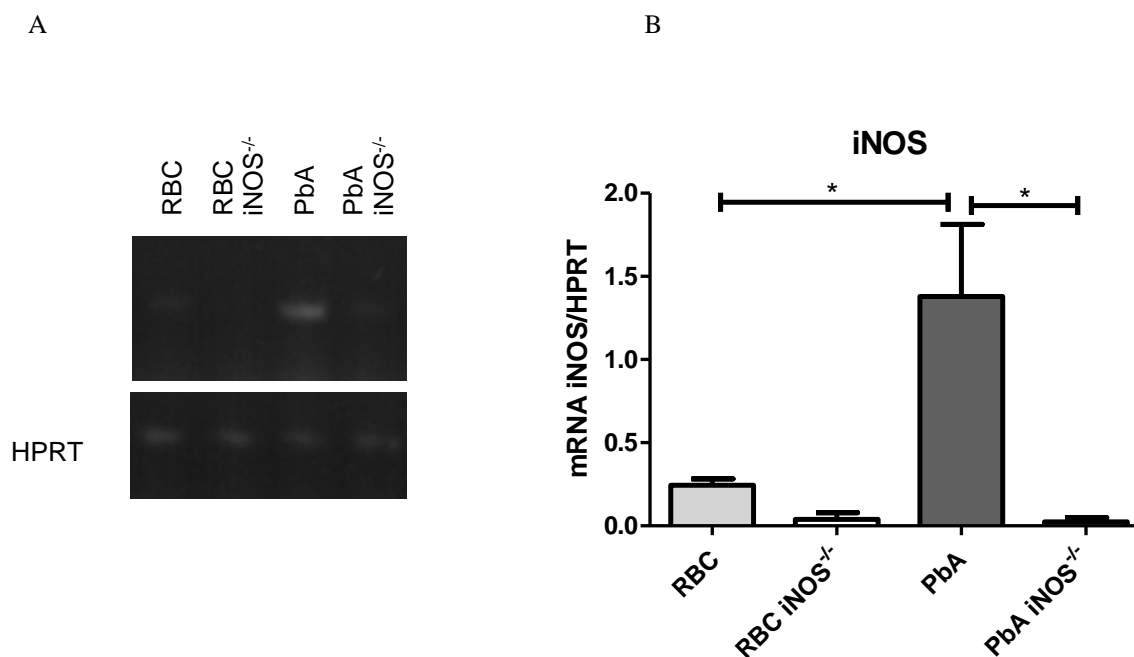


Figura 12 - Avaliação da expressão de iNOS em camundongos iNOS^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei ANKA*. 12A - Figura representativa da eletroforese para produto de PCR. 12B - Amostras de hipocampo de animais (n = 3/grupo) infectados com PbA foram coletadas no 6^o dia de infecção e analisadas por PCR-RT. *p<0.05, T test de Student.

4.5 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei ANKA*

A patogênese da malária cerebral está associada, dentre outros fatores, a montagem de resposta inflamatória relacionada a presença do parasita. Esse evento conta com o aumento da produção de citocinas que, durante uma resposta excessiva, podem contribuir para os danos teciduais observados. As Figuras 13A e 13B mostram a análise de duas importantes citocinas envolvidas, TNF- α e INF- γ , envolvidas na ativação endotelial e ativação de células inflamatórias. Podemos observar que, camundongos infectados com PbA apresentam níveis significativamente elevados se comparados ao controle não-infectado. Entretanto, para camundongos infectados que não apresentam a enzima iNOS, os níveis das citocinas descritas permanecem similares ao controle não-infectado.

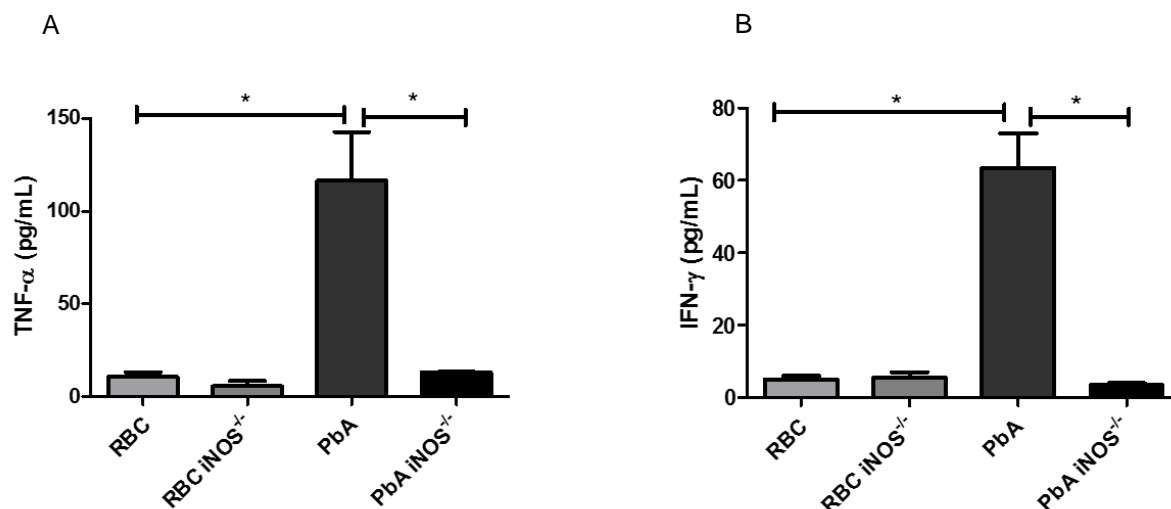


Figura 13 - Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos iNOS^{-/-} infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Amostras de sangue foram coletadas de camundongos infectados (n = 3/grupo) no 6º dia de infecção. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro e análise de citocina TNF-α (13A) e INF-γ (13B). *p < 0,05, ANOVA test, post-hoc Tukey.

4.6 Avaliação da produção de espécies reativas em camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-} durante a malária cerebral experimental

O estresse oxidativo é uma condição frequentemente observada em doenças com caráter neurodegenerativo (Hernandes *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015). A Figura 14 mostra os gráficos correspondentes a produção de espécies reativas entre os grupos em estudo a partir de dados referentes à análise de malondialdeído (MDA, um marcador de peroxidação lipídica) e da oxidação de grupamentos tióis proteicos, marcadores de estresse oxidativo, no cérebro de animais infectados com PbA. Animais *wild-type* infectados apresentam aumento na produção de MDA (14A) e redução da quantidade de tióis totais (14B) comparado com o grupo controle não infectado. A Figura 14A mostra que animais iNOS^{-/-} infectados apresentam níveis significativamente reduzidos de MDA se comparados ao controle *wild-type* infectado. Na Figura 14B, observamos menor oxidação dos grupamentos tióis, portanto, maior quantidade de tióis totais em animais iNOS^{-/-} comparado com o controle infectado. Em ambos os casos, observamos que a enzima iNOS interfere na quantidade de espécies reativas presentes e parece influenciar na patogênese da doença.

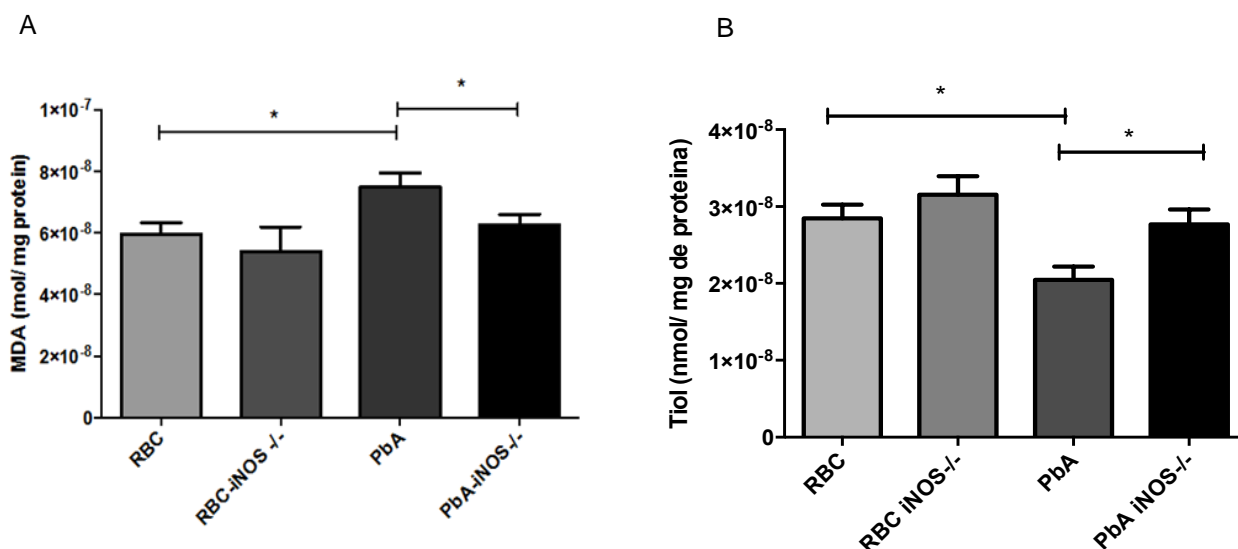


Figura 14 - Avaliação de estresse oxidativo no tecido cerebral de camundongos wild-type e iNOS^{-/-} infectados ou não com *Plasmodium berghei* ANKA no 6º dia após a infecção. 13A- A Figura mostra a produção de MDA entre os grupos experimentais. 13B – A figura demonstra a análise de quantificação de tíois totais em animais wild-type e iNOS^{-/-} infectados por PbA (n=6-10/grupo, repetição de 3 experimentos. * p<0,05 pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

4.7 Avaliação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) em camundongos C57BL/6 iNOS^{-/-} durante a malária cerebral experimental

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 (Davies MJ, 2011). A Figura 15 mostra que existe um aumento de atividade de MPO em animais *wild-type* infectados com PbA em relação ao controle não-infectado. Esse aumento não foi observado em animais iNOS^{-/-}, que mantêm essa atividade a níveis próximos do controle.

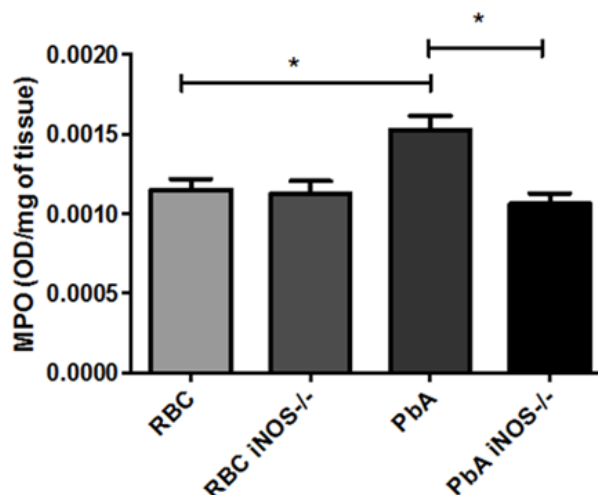


Figura 15 - Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos wild-type e iNOS^{-/-} infectados ou não com *Plasmodium berghei ANKA* no 6º dia após a infecção (n=6-10/grupo; repetição de 3 experimentos). *p<0,05 pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey.

4.8 Avaliação de mortalidade e parasitemia em camundongos C57BL/6 submetidos à inibição farmacológica da enzima iNOS através do tratamento com aminoguanidina

Com o objetivo de comparar e proporcionar uma nova forma de se analisar os efeitos da redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) excessivo proveniente da iNOS super-expressa em condições patológicas, foi utilizado o inibidor farmacológico aminoguanidina (AG) (100 mg/kg p.c. via i.p.). A droga foi administrada do dia 3 ao dia 6 após a infecção.

Na Figura 16A é demonstrada a curva de mortalidade comparativa entre camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* (PbA) tratados ou não com AG. Podemos observar que, também nesse caso, não houve diferença de mortalidade entre os grupos investigados. O tratamento com aminoguanidina não impediu o desenvolvimento da infecção, e ambos os grupos infectados, tratado ou não, mostraram parasitemia similar ao 6º dia após a infecção, como pode ser observado na Figura 16B .

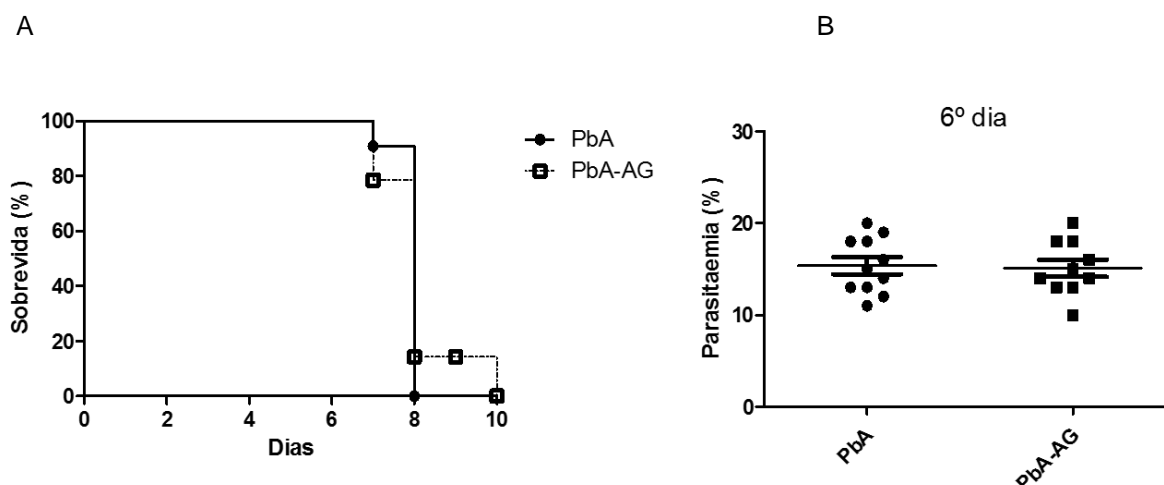


Figura 16 - Avaliação de curva de mortalidade e parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina. 15A-Avaliação da mortalidade entre camundongos infectados (n=6-10/grupo) tratados com AG em comparação com infectados não tratados, no sexto dia pós-infecção. Não houve diferença estatística entre os grupos Log-rank (Mantel-Cox) 15B-Parasitemia de camundongos C57BL/6 tratados com AG comparada com camundongos não tratados durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste T de Student.

4.9 Avaliação do escore clínico de camundongos C57BL/6 tratados com a droga aminoguanidina durante a malária cerebral experimental

Como descrito anteriormente para camundongos *iNOS*^{-/-}, no 6º dia após a infecção com PbA é realizada a avaliação dos sinais clínicos de malária grave. A Figura 17 mostra o escore clínico obtido de camundongos infectados tratados ou não com a droga aminoguanidina. Podemos observar diferença significativa entre as análises de escore clínico dos grupos estudados, porém o tratamento com o inibidor da enzima *iNOS* não impediu o desenvolvimento da malária grave.

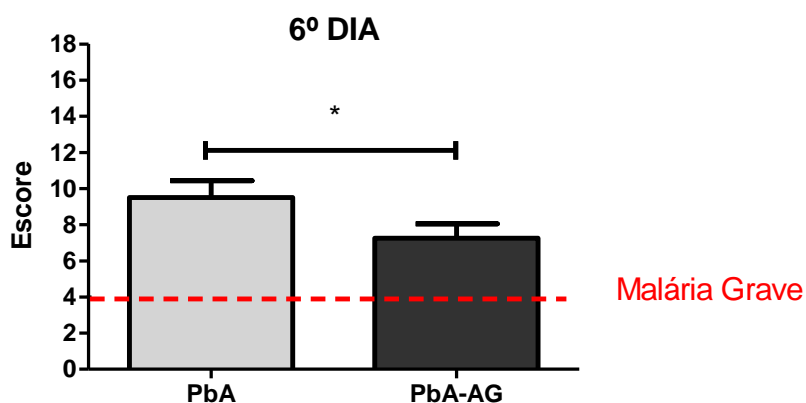


Figura 17 - Avaliação do escore clínico em camundongos C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina. O estabelecimento de malária cerebral com detecção dos sintomas relacionados foi analisado em camundongos (n=6-10/grupo; repetição de 3 experimentos) submetidos à inibição da enzima iNOS pelo tratamento com aminoguanidina no sexto dia pós-infecção. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ pelo test T de Student.

4.10 Avaliação do dano cognitivo em camundongos C57BL/6 submetidos à inibição de iNOS pelo tratamento com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental

As figuras abaixo apresentam as análises de capacidade cognitiva em camundongos C57BL/6 tratados com inibidor farmacológico específico da enzima iNOS, aminoguanidina (AG), após o desenvolvimento da malária cerebral experimental. Esse tratamento foi feito dos dias 3 ao 6 após a infecção e de maneira a se avaliar a prevenção de déficits cognitivos em camundongos infectados sujeitos ao tratamento comparado aos infectados não-tratados.

A Figura 18 mostra o resultado do teste freezing associado a memória aversiva. Observamos que camundongos infectados com PbA apresentam menor tempo de freezing ($p < 0,05$ de Tukey) se comparados ao controle não infectado. Assim, como o que foi visto em camundongos iNOS^{-/-}, a inibição dessa enzima pelo tratamento com aminoguanidina parece proteger os camundongos quanto a perda de memória, de modo que, camundongos infectados e tratados com AG apresentam tempo de freezing similar ao observado no grupo controle não-infectado.

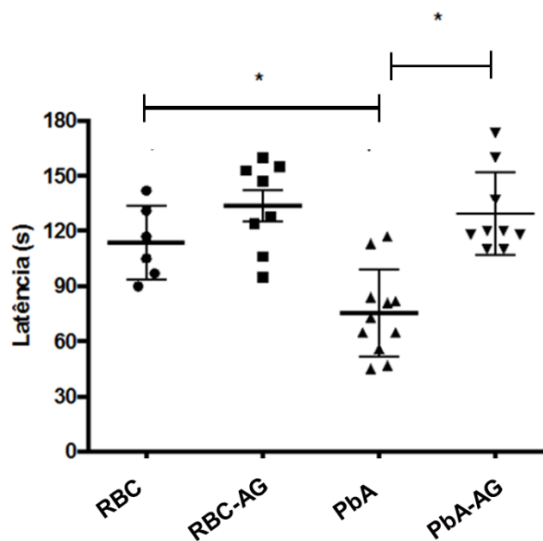


Figura 18 - Avaliação de dano cognitivo pelo teste freezing em camundongos infectados tratados ou não com aminoguanidina. Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo; repetição de 2 experimentos) foram infectados com 10^6 PRBC com *P. berghei* ANKA e submetidos ou não ao tratamento com AG do 3º ao 6º dia após a infecção. Durante os dias 6 ao 12 pós-infecção, os camundongos receberam o tratamento com cloroquina (25 mg/kg p.c. v.o). No 15º dia durante a sessão treino os animais receberam um choque de 0.6 mA (3 s) 3 minutos após serem colocados na caixa e outro 30s após o primeiro. Após 24 horas (teste) foi avaliada a possível formação de dano cognitivo representado pelo tempo de movimento dos animais na caixa de avaliação * $p < 0,05$ pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

A Figura 19 mostram o resultado da capacidade de aprendizado e a avaliação de memória espacial em camundongos C57BL/6 tratados ou não com aminoguanidina pelo teste labirinto aquático de Morris (Water Maze). Mais uma vez, o resultado corrobora ao que antes já foi observado em camundongos *iNOS*^{-/-}. Camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina mantêm a capacidade de aprendizado que é perdida durante a infecção com PbA (Figura 19A). Além disso, também foi observado que a infecção induz déficits de formação e consolidação de memória, o que não ocorre quando os camundongos são submetidos ao tratamento com a droga aminoguanidina (Figura 19B). Esse resultado indica, mais uma vez, que o bloqueio de enzima *iNOS*, possivelmente pela redução de NO a níveis fisiológicos, confere proteção quanto às funções cognitivas durante a infecção.

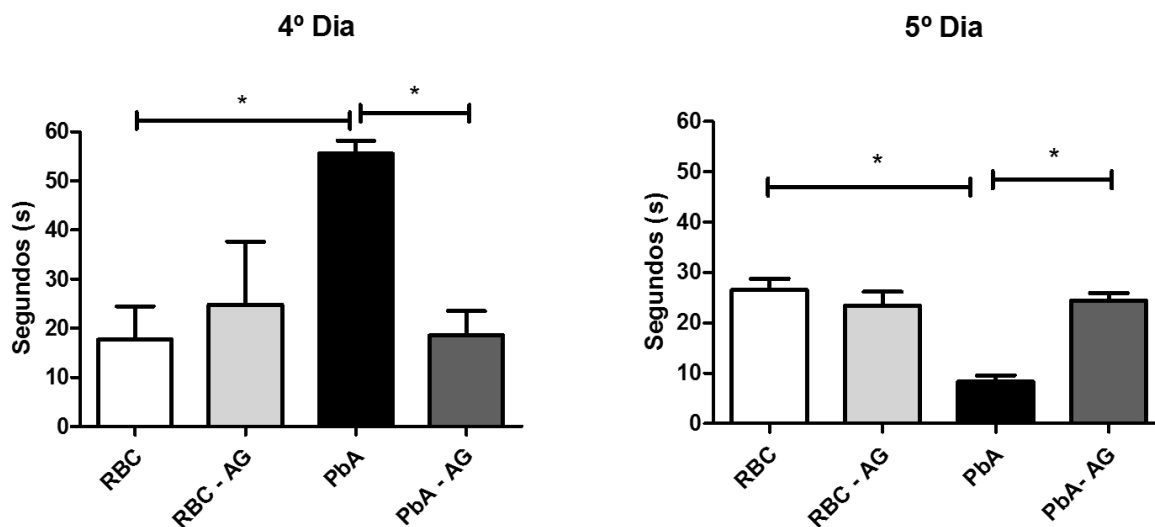


Figura 19 - Avaliação da capacidade de aprendizado (19A) e memória espacial (19B) em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados ou não com aminoguanidina através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze). Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo) foram infectados com 10^6 PRBC com *P. berghei* ANKA e tratados ou não com aminoguanidina do 3º ao 6º dia após a infecção. Os camundongos foram tratados do dia 6 ao 12 pós-infecção com cloroquina (25 mg/kg p.c. v.o). No 15º dia, os animais foram colocados em uma piscina com uma plataforma submersa e foram treinados a aprenderem o labirinto até a plataforma. Foram realizadas 4 sessões treino. A última sessão treino (4º dia) corresponde ao dado de avaliação da capacidade de aprendizado dos animais baseado no tempo de deslocamento até a plataforma. Após 24 horas (5º dia), a plataforma foi retirada e foi avaliada a formação e consolidação de memória, avaliando-se o tempo de permanência dos camundongos no quadrante em que a plataforma se encontrava anteriormente. * $p < 0,05$ pelo ANOVA test, pos-hoc Tukey.

4.11 Avaliação da expressão de moléculas de adesão em camundongo C57BL/6 infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina

A ativação endotelial é bem descrita na literatura durante o quadro de malária cerebral como um evento que acompanha o sequestro de hemácias parasitadas e que está associado ao aumento na expressão de moléculas de adesão. A Figura 20 mostra a análise da expressão de ICAM-1, uma importante proteína envolvida nesse processo, em camundongos tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental. Observamos que, camundongos infectados com PbA sofrem aumento (* $P < 0,05$ teste de Tukey) na expressão de ICAM-1 comparado ao controle não infectado e que é inibido pelo tratamento com aminoguanidina.

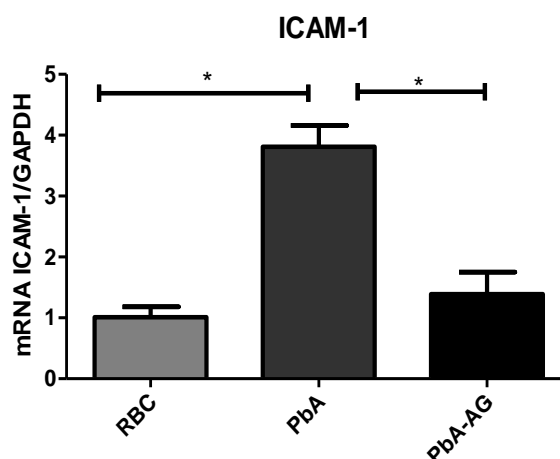


Figura 20 - Avaliação da expressão de ICAM-1 em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com aminoguanidina. Amostras de córtex de animais infectados (n = 3/grupo) com PbA foram coletadas no 6º dia de infecção e analisadas por qRT-PCR. *p<0,05, ANOVA test, post-hoc Tukey

4.12 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados com aminoguanidina

A produção de citocinas no parênquima cerebral pode ser observada em função da neuroinflamação estabelecida no curso da malária cerebral. A Figura 21 mostra o gráfico representativo da expressão da citocina TNF- α no cérebro de camundongos infectados com PbA, tratados ou não com aminoguanidina. O resultado mostra que existe um aumento significativo de expressão de TNF- α após o 6º dia da infecção com PbA. No entanto, o uso da droga AG conteve esse aumento, de modo que, camundongos infectados tratados com AG mostraram níveis normais de TNF- α no tecido cerebral.

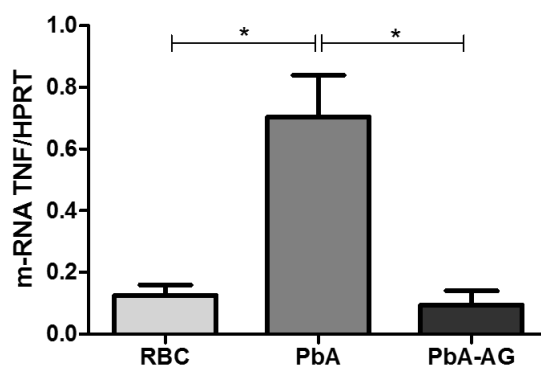


Figura 21 – Avaliação da expressão de TNF- α no cérebro de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados ou não com aminoguanidina. Amostras de hipocampo coletadas no 6º dia após a infecção foram submetidas a análise por qRT-PCR (n = 3/grupo). * $p < 0,05$, ANOVA test, post-hoc Tukey

4.13 Avaliação da ativação de Microglia em Camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental

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 (M1). Na forma ativada, a microglia apresenta mudanças morfológicas e passa a apresentar um formato amebóide e número reduzido de ramificações.

Observamos na figura 22 cortes histológicos da região CA1 do hipocampo marcados com Iba-1, um marcador de microglia ativada. Camundongos infectados com PbA apresentam ativação da microglia se comparado ao controle não-infectado, demonstrado pelo aumento da intensidade de fluorescência para o marcador Iba-1 (Figura 22). Em camundongos infectados, as células apresentam-se mais circulares e redução das ramificações. Podemos observar ainda que, em camundongos infectados tratados com a droga aminoguanidina, a ativação de microglia manteve-se a níveis normais, com padrões morfológicos similares aos encontrados no controle não-infectado.

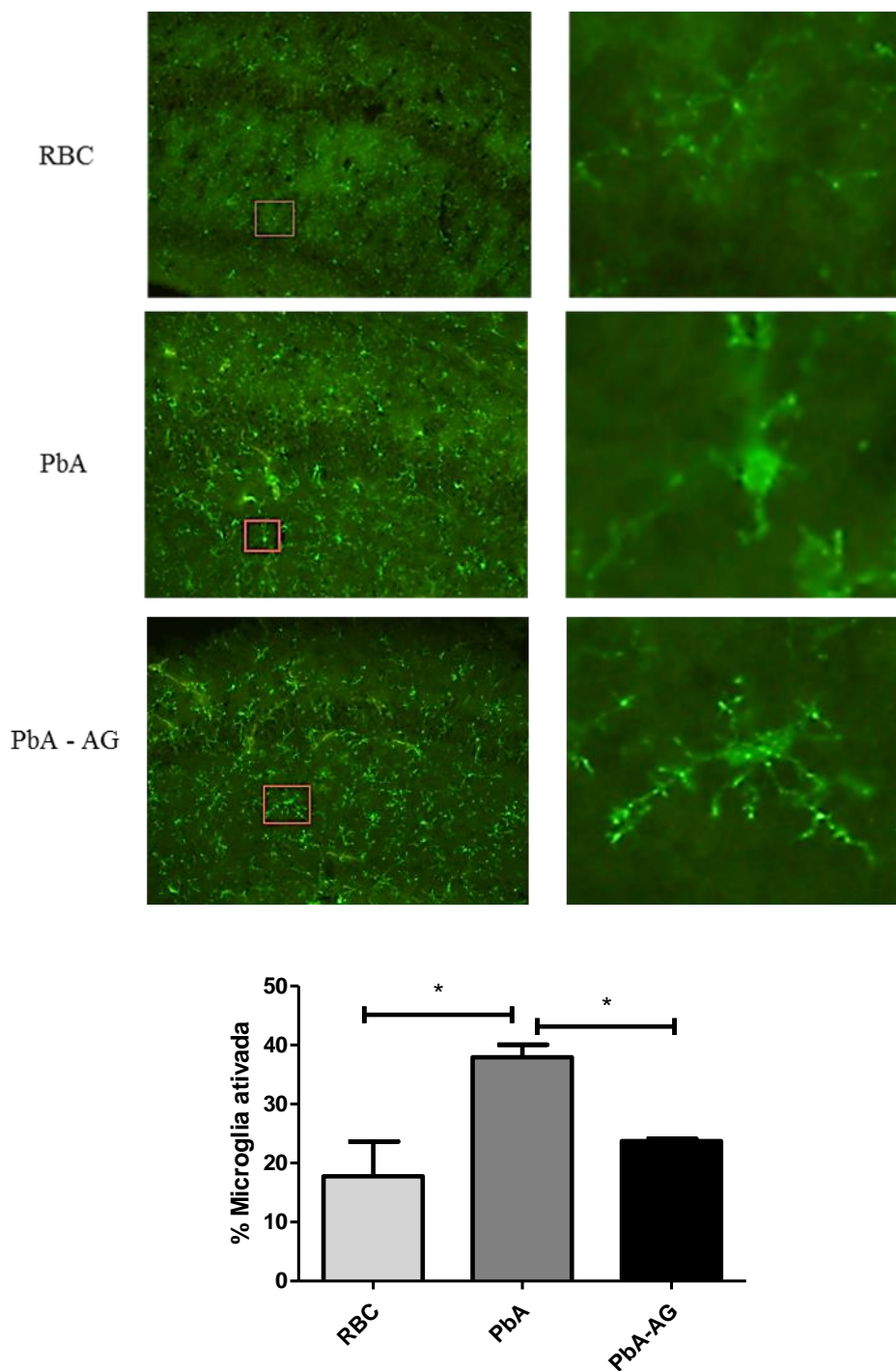


Figura 22- Avaliação da ativação de micróglia em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com aminoguanidina. Foram realizados cortes histológicos da região CA1 a partir de amostras cerebrais (n = 3/grupo) coletadas no 6º dia após a infecção. Esses cortes foram marcados com anticorpo anti-Iba-1 e fotografados por microscópio de fluorescência (objetiva de 20x) e microscópio confocal (objetiva de 63x). A análise de quantificação de micróglia ativadas foi feita com o auxílio do *plugin cell counter* do programa *ImageJ*. * p<0,05 pelo teste T de Student

4.14 Avaliação da expressão de iNOS em camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental

A enzima iNOS, presente, principalmente, em células inflamatórias, tem sua expressão aumentada em situações que exijam a defesa do organismo e produção de espécies reativas. Durante a malária cerebral, o aumento de expressão da iNOS parece ser deletério e contribuir com a progressão da doença (Maneerat *et al.*,2000). A Figura 23 mostra o gráfico de avaliação da expressão da enzima iNOS no córtex de camundongos infectados com PbA tratados ou não com aminoguanidina no 6º dia após a infecção. Podemos observar na figura abaixo, que não houve diferença significativa entre os grupos em estudo.

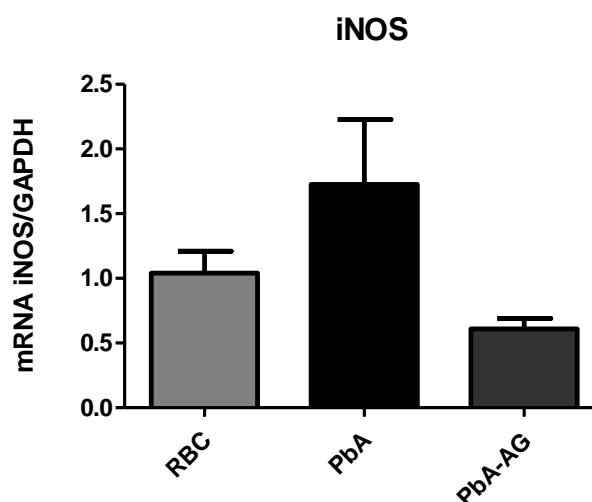


Figura 23 - Avaliação da expressão de iNOS em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com aminoguanidina. Amostras de córtex de animais infectados (n = 3-5/grupo) com PbA foram coletadas no 6º dia de infecção e analisadas por qRT-PCR. Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste T de Student.

4.15. Avaliação de apoptose neuronal em camundongos C57BL/6 tratados com aminoguanidina durante a malária cerebral experimental

A malária cerebral se caracteriza por eventos que levam a danos teciduais e sequelas cognitivas. Essas, podem estar relacionadas a perdas neuronais por ativação de processos de morte celular. A Figura 24 mostra a avaliação de morte apoptótica neuronal em camundongos infectados com PbA submetidos ou não ao tratamento com aminoguanidina no 6º dia após a infecção,

através do aumento nos níveis de caspase-3 em sua forma ativa, clivada, em amostras de córtex e hipocampo. Nas Figuras 24A e 24B, observamos, no córtex e no hipocampo, respectivamente, aumento nos níveis de caspase-3 clivada ($*p < 0,05$ teste de Tukey) durante a infecção com PbA. Na Figura 24A, podemos ver ainda, que o uso da droga aminoguanidina impediu o aumento de caspase-3 clivada no córtex, sugerindo que a inibição de iNOS, nesse caso, possa conferir proteção em relação à apoptose neuronal. Na Figura 24B, não foi observada diferença significativa em relação aos níveis de caspase-3 clivada no hipocampo de camundongos infectados tratados ou não com aminoguanidina.

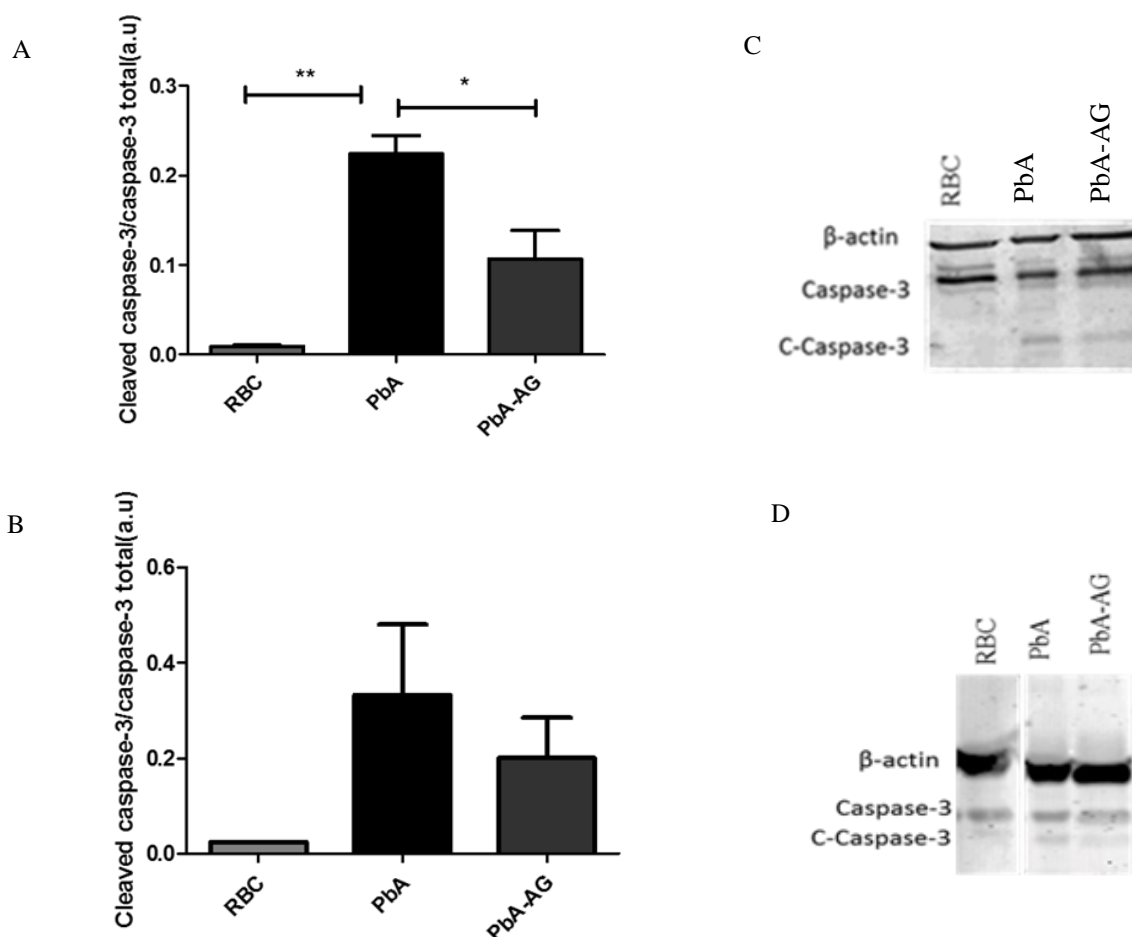


Figura 24 – Avaliação dos níveis de caspase-3 clivada em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com aminoguanidina. 23A - Níveis de caspase-3 clivada no córtex. 23B - Níveis de caspase-3 clivada no hipocampo. 23C - Figura representativa da análise de caspase-3 clivada no córtex. 23D - Figura representativa da análise de caspase-3 clivada no hipocampo. (n = 3-5/ grupo) $*p < 0,05$ ANOVA post-hoc Tukey

4.16 Avaliação do bloqueio de nNOS na disfunção cognitiva observada durante a malária cerebral experimental

A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é muito importante, principalmente, quanto ao papel do óxido nítrico na transmissão sináptica e para o processo de memória e aprendizagem. Ocorre que, assim como iNOS, a NOS neuronal está associada a muitas neuropatologias, especialmente, quanto a participação em processos de excitotoxicidade. Utilizamos o 7-nitroindazol (25mg / kg via oral), um inibidor de NOS que parece ser preferencialmente seletivo para nNOS (Sun *et al.*, 2005; Rajasekaran, 2005). A Figura 25 mostra que, durante a infecção com *Plasmodium berghei ANKA*, o tratamento com 7-nitroindazol foi promissor em proteger os camundongos das disfunções cognitivas, observadas em camundongos infectados não tratados. A Figura 25A mostra a eficácia do tratamento na manutenção da capacidade de aprendizado que é perdida durante a malária cerebral experimental. A Figura 25B mostra, ainda, a proteção do tratamento quanto a perda de memória. O resultado sugere não somente um novo alvo a ser estudado, mas também corrobora os dados obtidos com a iNOS até aqui, pois indica que qualquer perturbação nos níveis fisiológicos de óxido nítrico, possivelmente devido ao seu potencial de formar espécies reativas em condições patológicas, parece ser prejudicial durante a patogênese da malária cerebral.

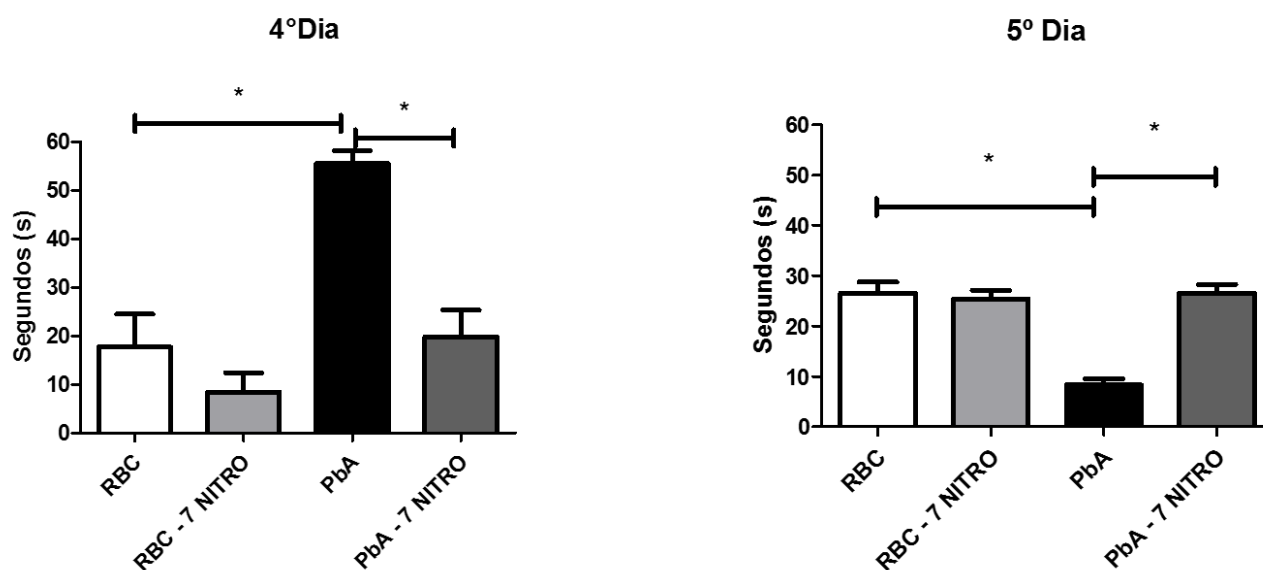


Figura 25 - Avaliação da capacidade de aprendizado (24A) e memória espacial (24B) em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados ou não com 7-nitroindazol através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze). Camundongos C57BL/6 (n=6-10/grupo) foram infectados com 10^6 PRBC com *P. berghei* ANKA e tratados ou não com 7-nitroindazol do 6º ao 12º dia após a infecção em conjunto com antimalárico. Os camundongos foram tratados com cloroquina por 7 dias, iniciando no dia 6 pós-infecção (25 mg/kg p.c. v.o). No 15º dia, os animais foram colocados em uma piscina com uma plataforma submersa e foram treinados a aprenderem o labirinto até a plataforma. Foram realizadas 4 sessões treino. A última sessão treino (4º dia) corresponde ao dado de avaliação da capacidade de aprendizado dos animais baseado no tempo de deslocamento até a plataforma. Após 24 horas (5º dia), a plataforma foi retirada e foi avaliada a formação e consolidação de memória, avaliando-se o tempo de permanência dos camundongos no quadrante em que a plataforma se encontrava anteriormente. * $p < 0,05$ pelo ANOVA test, pos-hoc Tukey.

5. DISCUSSÃO

A malária é, ainda nos dias de hoje, um sério problema de saúde pública e afeta, principalmente, as populações pobres de áreas tropicais e subtropicais. Em 2016, mais 400 mil óbitos foram notificados (OMS, 2016). A malária cerebral é uma das formas mais graves observada e conta com altos índices de mortalidade (OMS, 2016; Idro *et al.*, 2016).

A malária cerebral é uma complicação neuropatológica grave causada pela infecção por *Plasmodium falciparum* (Sahu *et al.*, 2015). As principais manifestações clínicas observadas são perda da consciência e coma e, dos pacientes que sobrevivem, cerca de 25% podem apresentar sequelas cognitivas decorrentes do comprometimento do sistema nervoso central (Idro *et al.*, 2016). Boivin e colaboradores (2007) descreveram a malária cerebral como a principal causa do déficit cognitivo observado em crianças de áreas endêmicas, caracterizado por disfunções de longo prazo, incluindo dificuldades de linguagem, problemas comportamentais, déficits de atenção e memória (Bagirana *et al.*, 2011). Esses danos ocorrem independentemente da administração de antimaláricos nos pacientes, o que demonstra a necessidade da busca por novas terapias voltadas à prevenção e/ou reversão desse quadro.

Este estudo visa à análise dos efeitos da enzima iNOS durante o curso da malária cerebral experimental. Muitos trabalhos já verificaram a ocorrência de uma expressão elevada de iNOS por células do sistema imune ativadas por citocinas pró-inflamatórias quando há uma desregulação homeostática (Nahrevarian, 2006; Maiti *et al.*, 2009). Isso também pode ser observado em células do sistema nervoso central, como microglia e astrócitos, que se tornam ativadas frente ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que atuam sobre o tecido cerebral em consequência da perda da integridade da barreira hematoencefálica (Liu *et al.*, 2012). O aumento da expressão da enzima iNOS provoca o aumento da concentração de NO, uma molécula de grande importância na malária cerebral cujo papel ainda é pouco compreendido e dá margem à diversos questionamentos quanto a sua atuação prejudicial ou benéfica, na patogênese da doença (Anstey *et al.*, 1996; Maneerat *et al.*, 2000; Nahrevarian, 2006; Eisenhut, 2014; Predonzani *et al.*, 2015). Neste trabalho, utilizamos camundongos deficientes de enzima iNOS

submetidos ao modelo experimental de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Observamos em nossas análises que animais C57BL/6 *wild-type* e iNOS^{-/-} infectados com PbA não mostraram diferenças em relação à parasitemia ou sobrevida durante a infecção. Esses dados são condizentes com estudos realizados anteriormente, que também mostraram que a ausência de iNOS não interfere na carga parasitária em modelos murinos de malária (Favre *et al.*, 1999 a,b). No presente estudo, verificamos que houve aumento de parasitemia a níveis superiores a 10% no 6º dia de infecção e mortalidade presente já no 7º dia, o que indica que a deficiência da enzima iNOS não interfere no crescimento e multiplicação do parasita durante o curso infeccioso.

A análise de alterações neurológicas é importante em doenças que afetam o sistema nervoso central, pois são indicadores da gravidade da doença. Como ferramenta para a análise dos danos neurológicos associados à malária cerebral experimental, a utilização do protocolo SHIRPA é de grande importância (Rogers *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2010). Segundo Reis e colaboradores (2010), camundongos C57BL/6 infectados com PbA demonstram, no 6º dia de infecção, alterações de reflexo e função sensorial, no comportamento motor e na função autônoma, além de alterações no tônus muscular e força quando submetidos aos testes do SHIRPA. A partir de observações do nosso grupo, detectou-se que presença de 4 ou mais alterações é correspondente à presença de petéquias cerebrais, condição observada no estabelecimento da malária cerebral (dados não mostrados). Neste trabalho utilizamos parâmetros baseados no protocolo SHIRPA para a avaliação de sinais clínicos específicos associados a malária grave, e que poderiam estar relacionadas com a patologia cerebral. Segundo nossos resultados a ausência da enzima iNOS teve interferência quanto a gravidade da infecção. Observamos que camundongos iNOS^{-/-} infectados com PbA sofrem reduções significativas no escore clínico se comparado ao controle *wild-type* infectado, e não desenvolvem a malária grave.

Em doenças neurodegenerativas, déficits de memória e aprendizagem são constantemente observados (Hugo and Ganguli, 2014). Em observações clínicas, é visto que perdas cognitivas podem ocorrer, também, em doenças infecciosas graves (Boivin *et al.*, 2007; Annane *et al.*, 2015). De fato, pacientes que

sobrevivem a malária cerebral apresentam dano cognitivo mesmo após o tratamento com antimaláricos, o que exige a busca de novos tratamentos (Idro *et al.*, 2010a, Idro *et al.*, 2010b). No trabalho aqui exposto, grupos experimentais foram submetidos à avaliação cognitiva de perda de memória após o tratamento com cloroquina (25 mg/kg v.o.).

Como descrito anteriormente, a memória pode ser dividida quanto ao seu conteúdo ou quanto ao tempo de duração (Izquierdo *et al.*, 2013). Segundo Izquierdo (2008), os processos de evocação mostram claras diferenças quanto ao requerimento molecular entre as memórias de curta e longa duração. No primeiro caso, receptores glutamatérgicos AMPA são os principais envolvidos, enquanto que na memória de longa duração a ativação de receptores glutamatérgicos varia de acordo com a estrutura cerebral (região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal e cíngulo anterior). Além disso, existem diferenças quanto a intervenção de fosfoquinases na evocação de ambas as memórias (Izquierdo, 2008). Neste trabalho, analisamos tanto memórias de curta como de longa duração, avaliando possíveis déficits associados à formação de memória aversiva e memória espacial diante da deficiência da enzima iNOS durante a malária cerebral experimental. As memórias do tipo aversivo, bem como as associadas ao movimento e orientação no espaço, são memórias extremamente conservadas e largamente associadas à sobrevivência do ser no meio ambiente em que se encontra (Izquierdo and Medina, 1997; Vorhees and Williams, 2014; Izquierdo *et al.*, 2016). Utilizamos os testes de esQUIVA inibitória (escape ao estímulo aversivo) e o teste freezing (resposta condicionada ao medo), já largamente utilizados em laboratório, para a avaliação de memória aversiva (Izquierdo *et al.*, 2016). A memória espacial foi averiguada através do desempenho dos camundongos no labirinto aquático (Water Maze) (Vorhees and Williams, 2014). Os resultados obtidos na execução dos testes comportamentais mostraram que camundongos infectados iNOS^{-/-} não desenvolvem sequelas cognitivas, indicando que reduções nos níveis de NO durante a patologia parecem oferecer melhores prognósticos.

A malária cerebral é uma patologia complexa que apresenta diversos mecanismos envolvidos em seu processo de formação. A oclusão da microvasculatura cerebral decorrente do fenômeno de citoaderência e a intensa resposta inflamatória associada à presença do parasita são os principais fatores

envolvidos (Craig *et al.*, 2012; Hansen, 2012). Citocinas pró-inflamatórias são de suma importância na coordenação dos eventos patogênicos posteriores. Nesse contexto, TNF- α e INF- γ são bem descritas e atuam tanto na ativação do endotélio quanto na ativação dos leucócitos que são recrutados por quimiocinas para o local do sequestro e contribuem com a exacerbação do processo inflamatório podendo comprometer a integridade da barreira hematoencefálica (Ioddanis *et al.*, 2013; Kinra and Dutta, 2013; Hunt *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que camundongos iNOS^{-/-} infectados com PbA apresentam níveis significativamente reduzidos de TNF- α e INF- γ no soro quando comparados com o controle *wild-type* infectado. A ausência da iNOS parece ser benéfica e reduzir os eventos inflamatórios envolvidos no estabelecimento da malária cerebral. Isso, provavelmente, ocorre em virtude do controle dos níveis de óxido nítrico, permitindo que as funções fisiológicas dessa molécula sejam mantidas, o que tem sido mostrado, em diversos trabalhos, ser de suma importância para a prevenção da doença em modelos experimentais (Cabrales *et al.*, 2011, Carvalho *et al.*, 2014). No entanto, alguns trabalhos também têm sugerido que NO produzido em grandes concentrações pela iNOS possa modular positivamente a expressão de mediadores inflamatórios como COX-2 diante de um desafio patológico (Yuste *et al.*, 2015), porém este fenômeno precisa ser melhor investigado.

As complicações da malária cerebral têm sido largamente associadas a desregulação da resposta imunológica (Pradhan and Ghosh, 2013). A atividade exacerbada de células imunológicas tem como um dos efeitos o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) que sobrepõem a atividade dos antioxidantes e causam o estresse oxidativo (Percário *et al.*, 2012). Um dos fatores associados é o aumento da produção de NO via NOS induzível. Em nossas análises mostramos que a enzima iNOS sofre aumento de expressão durante a malária cerebral experimental. Em condições de estresse oxidativo, o NO pode se associar a espécies reativas de oxigênio formando intermediários reativos de nitrogênio (RNS), como o peroxinitrito (Radi, 2013). Essa molécula é altamente reativa e está envolvida em vários eventos danosos ao organismo, podendo causar danos a níveis celulares e moleculares (Prolo *et al.*, 2014). Avaliamos o efeito da ausência de iNOS e, conseqüentemente, de NO oriundo dessa enzima, através da quantificação de

indicadores clássicos dos processos oxidativo. Níveis de MDA (malondaldeído) provenientes da peroxidação lipídica e a quantidade de grupamentos tióis totais foram verificados. Observamos que os níveis de MDA mostraram-se significativamente reduzidos em camundongos iNOS^{-/-} se comparados ao controle *wild-type* infectado. Com a menor oxidação, camundongos iNOS^{-/-} apresentaram aumento na quantificação de tióis totais em relação ao controle infectado.

Ainda nesse contexto, também avaliamos a atividade de mieloperoxidase. A mieloperoxidase é uma heme peroxidase presente nos grânulos intracelulares de fagócitos, que auxilia no combate a invasores pelo sistema imune e tem como um dos mecanismos de atuação a geração de espécies oxidantes que, normalmente, é benéfica para o organismo (Davies MJ, 2011). No entanto, sítios inflamatórios têm sido associados com danos teciduais, de modo que estímulos nocivos podem levar essa enzima a gerar uma alta quantidade de espécies reativas que levam a diversas injúrias, incluindo desordens neurodegenerativas (Davies MJ, 2011; Ray and Katyal, 2016). Em nossas observações, mostramos que camundongos iNOS^{-/-} apresentam uma redução na atividade de MPO se comparados com o grupo *wild-type* infectado. Esse dado reforça a idéia de que o óxido nítrico, em condições de adversidade, contribua com o processo inflamatório e pró-oxidativo estabelecido.

Além dos estudos realizados em camundongos iNOS^{-/-}, este trabalho abordou a utilização de aminoguanidina, um inibidor farmacológico específico para a enzima. Essa estratégia foi utilizada de modo a corroborar os dados já obtidos, reforçando a tese de o bloqueio de NO proveniente de iNOS possa favorecer um maior controle da doença, principalmente, a nível cognitivo.

Assim como já observado nas avaliações feitas em camundongos iNOS^{-/-}, o uso da aminoguanidina como intervenção farmacológica não promoveu alterações quanto aos níveis parasitêmicos ou mortalidade averiguada. Favre e colaboradores (1999 b) já haviam demonstrado que, assim como em observado para iNOS^{-/-}, o tratamento com aminoguanidina não interfere na susceptibilidade à infecção durante o modelo experimental de malária cerebral. Além disso, o uso da droga, diferentemente do que foi observado anteriormente nas análises com *knockout*, não foi capaz de proteger os animais do desenvolvimento de malária grave, apesar de haver diferença significativa de escore clínico entre os grupos

infectados tratados e não tratados com aminoguanidina. Segundo Asensio e colaboradores (1993) a inibição farmacológica de enzimas NOS demonstra ineficácia na prevenção da malária grave, o que possivelmente justifica a diferença observada entre as duas estratégias abordadas. No entanto, com a administração de aminoguanidina, mais uma vez se observou proteção quanto a formação de sequelas cognitivas observadas após a recuperação da infecção com antimalárico, corroborando a idéia de que mudanças na sinalização nitrérgica homeostática possam participar do estabelecimento de disfunções observadas durante a malária cerebral experimental.

As investigações acerca da malária cerebral mostram que a ativação endotelial é um dos eventos primários observados, ocorrendo subsequentemente ao sequestro de hemácias parasitadas e ao aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias (Storm and Craig, 2014). As células endoteliais sob estímulos inflamatórios regulam a expressão de moléculas de adesão, que aumentam durante o processo infeccioso e auxiliam a progressão da doença. Dentre essas, destaca-se ICAM-1 (molécula de adesão endotelial intracelular-1), que atua como receptor para o ligante PfEMP-1 presente em hemácias parasitadas e também para ligantes presentes nos leucócitos, contribuindo com a evolução da malária cerebral (Adukpo *et al.*, 2013; Mandala *et al.*, 2015). Nossas análises mostraram que camundongos tratados com aminoguanidina após a infecção com PbA não apresentam expressão aumentada de ICAM-1 como observado em camundongos infectados não tratados e, portanto, que a inibição de iNOS parece ter alguma influência em relação a ativação endotelial associada a patologia. Isso decorre, possivelmente, em função da redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como foi observado em iNOS^{-/-}. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor elucidar esse dado em relação ao tratamento com a droga aminoguanidina.

A ativação da resposta imunológica, com plena atividade das células citotóxicas, e o estresse oxidativo observado são eventos relacionados à processos apoptóticos neurodegenerativos durante a malária cerebral, e podem estar envolvidos no comprometimento cognitivo. (Wiese *et al.*, 2006). A inflamação causa o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e a quebra da mesma é consequência do dano endotelial provocado pela congestão dos vasos cerebrais e pelo estresse oxidativo seguido de apoptose ao qual as células endoteliais são

submetidas (Punsawad *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016). Isso facilita o contato das citocinas pró-inflamatórias com o sistema nervoso central e a ativação de células gliais (Mander and Brown, 2005). A exemplo de células imunológicas do sistema periférico, microglia e astrócitos, células do sistema nervoso central, são ativadas frente a estímulos de perigo, sendo capazes de produzir citocinas e radicais livres no parênquima cerebral (Spanos *et al.*, 2015; Lee and McLean, 2015). Nossos dados mostraram que, assim como observado no sangue para camundongos iNOS^{-/-}, camundongos infectados tratados com aminoguanidina apresentam níveis reduzidos de TNF- α no cérebro comparado aos infectados não-tratados. Além do que já foi citado anteriormente, algumas vias de sinalização são ativadas por espécies reativas e também podem induzir o lançamento de citocinas pró-inflamatórias (Genestra, 2007; Son *et al.*, 2011). Assim sendo, acreditamos que, o controle na produção de intermediários reativos, já mostrado nesse trabalho, possa contribuir também com as reduções dos níveis de citocinas observados em ambas as análises.

A microglia pode apresentar dois perfis de ativação diferentes, pró ou anti-inflamatório, dependendo das pistas presentes no ambiente em que se encontram (Cherry *et al.*, 2014). Citocinas pró-inflamatórias polarizam a microglia em direção ao perfil M1, a favor da inflamação (Cherry *et al.*, 2014). Esse evento já foi observado durante a malária cerebral experimental (Medana *et al.*, 1997; Wiese *et al.*, 2006). Cappucini e colaboradores (2016) demonstraram que existe um aumento na transcrição de genes associados com o perfil pró-inflamatório microglial durante a malária cerebral experimental. As mudanças de perfil observadas durante a ativação de micróglia são acompanhadas de mudanças morfológicas, e a polarização para perfil M1 apresentam fenótipo ameboide e contração citoplasmática, condizentes com a maior atividade das mesmas (Medana *et al.*, 1997; Spanos *et al.*, 2015). A ativação da microglia foi analisada nesse estudo com base na mudança morfológica típica de células ativadas, na região CA1 do hipocampo. Conforme descrito anteriormente, essa área participa do circuito de fibras nervosas envolvidas na transmissão sináptica associada a formação e consolidação de memória e qualquer insulto local pode estar associado a presença de déficit neurocognitivo. Os resultados obtidos em nossas análises mostraram que microglias da região CA1 do hipocampo apresentam um perfil de ativação

diferenciado entre os grupos tratados ou não com a droga aminoguanidina. Observamos que o tratamento com aminoguanidina restringiu a ativação de microglia submetidas a infecção com PbA, que demonstraram um perfil menos ativado com presença de ramificações e diferente do fenótipo amebóide encontrado no grupo não tratado.

Microglias com perfil pró-inflamatório sofrem aumento de expressão de enzimas importantes na sua atividade, como a NADPH oxidase e a enzima iNOS (Mander and Brown, 2005). Esta última, classicamente expressa em fagócitos ativados, tem sido descrita como marcador chave de microglia no perfil M1 (Chhor *et al.*, 2013; Zaho *et al.*, 2014). Como parte das análises deste projeto, a expressão da enzima iNOS foi averiguada, porém não foi constatado diferença significativa na expressão da enzima iNOS entre os grupos infectados tratados ou não com aminoguanidina. Apesar disso, o dado é importante, pois nos permite inferir que o efeito da droga seja na atividade e não na expressão enzimática. Contudo, isso precisa ser melhor analisado.

A ativação crônica das células gliais e superexpressão das enzimas envolvidas favorece a neuroinflamação e a produção espécies reativas (ROS e RNS) no ambiente cerebral (Bernhardi *et al.*, 2015). Isso pode ocasionar injúrias locais e desencadear cascatas de morte celular (Mendéz-Armenta *et al.*, 2014). Ambas as vias, extrínseca e intrínseca, estão relacionadas aos processos apoptóticos das células neuronais e associadas às disfunções neurológicas observadas (Li *et al.*, 2013). Neste trabalho, os níveis de caspase-3 clivada, comum às duas vias envolvidas na morte apoptótica, estavam reduzidos em camundongos infectados com PbA e tratados com aminoguanidina, nas regiões do córtex e do hipocampo, se comparados com o grupo infectado não tratado. Esse resultado demonstra que o bloqueio da atividade iNOS parece favorecer a sobrevivência neuronal.

O óxido nítrico é uma molécula produzida por 3 diferentes tipos de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), o que já foi descrito anteriormente. Ocorre que, além da enzima iNOS, alguns autores têm sugerido que níveis desregulados de NO observados em disfunções neuropatológicas perpassem também por um possível aumento da isoforma neuronal de NOS, associando esse evento às sequelas cognitivas observadas (Liu *et al.*, 2007). A enzima nNOS é encontrada,

majoritariamente, nas células neuronais e tem sido muito associada aos eventos de excitotoxicidade relacionados a doenças neurodegenerativas, em que seu aumento de expressão contribui com a produção de mais NO e favorece a formação de espécies reativas e a indução de diversas vias de morte celular no neurônio (Lai *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). Outros trabalhos, no entanto, tem mostrado que a nNOS é importante no controle da função vascular, que é prejudicada durante a malária cerebral experimental (Ong *et al.*, 2013). Resolvemos avaliar o efeito do bloqueio de nNOS em nosso modelo experimental, a fim de aprofundar nossas análises quanto a participação do óxido nítrico a níveis elevados no desenvolvimento do dano cognitivo associado a malária cerebral experimental. Nossas análises mostraram que, assim como já observado nos estudos em iNOS, o efeito do bloqueio de nNOS foi promissor em impedir o estabelecimento de dessas disfunções, o que demonstra que, de fato, produções excessivas de NO no curso da doença parecem ser prejudiciais.

A enzima iNOS, foco deste trabalho, tem se mostrado cada vez mais, uma enzima de extrema importância em diversas patogenias e os resultados aqui expostos, sugerem sua relevância na progressão da malária cerebral, especialmente, na esfera cognitiva. A malária cerebral é composta por diversos eventos inflamatórios, oxidativos e vasculares associados. Este estudo buscou a compreensão do papel da enzima iNOS no contexto patogênico da doença. Em situações adversas, a enzima iNOS sofre aumento de expressão e responde elevando o aporte de NO a níveis acima dos fisiológicos, o que pode ser citotóxico para o organismo (Dreschel *et al.*, 2012). Os resultados mostrados demonstram que, de fato, parece existir uma relação entre a enzima iNOS superexpressa e os eventos deletérios observados no curso da patologia, inclusive quanto ao surgimento de sequelas cognitivas observadas, sugerindo que a enzima iNOS possa ser um bom alvo terapêutico a ser estudado.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, utilizando o modelo murino com camundongos knockouts para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e o tratamento com o inibidor seletivo da enzima iNOS, a aminoguanidina, foi avaliada a resposta da sua ausência ou bloqueio para prevenção dos eventos envolvidos na patogênese da malária cerebral, bem como dos danos cognitivos decorrentes da doença. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

A ausência da enzima ou o bloqueio farmacológico da enzima iNOS não afetaram a parasitemia ou a sobrevivência dos animais durante a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA;

Observou-se que camundongos iNOS^{-/-} não desenvolvem a malária grave. No entanto, essa proteção não foi observada pelo tratamento com inibidor farmacológico, aminoguanidina, apesar do efeito da droga na redução do escore clínico durante a infecção;

A ausência da enzima iNOS e o bloqueio farmacológico da enzima foram eficientes em reduzir os fatores relacionados com a patogenia da malária cerebral, como a liberação e a produção de citocinas pró-inflamatórias, o aumento na expressão de moléculas de adesão e a formação de espécies reativas;

O bloqueio de iNOS reduz o perfil ativado de microglia;

A ausência e o bloqueio da enzima iNOS interferem na formação do dano cognitivo, prevenindo-o em animais que sobreviveram a malária cerebral após o tratamento com anti-maláricos. As funções de memória, analisadas pelos testes de memória aversiva freezing e esquivas inibitórias, foram mantidas em camundongos iNOS^{-/-} ou submetidos ao inibidor farmacológico.

7. PERSPECTIVAS

Em camundongos iNOS^{-/-} ou submetidos ao bloqueio da enzima pelo inibidor aminoguanidina:

Avaliar a adesão e rolamento leucocitários nos vasos cerebrais, bem como o fluxo sanguíneo;

Continuar a investigar a liberação e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , KC, MCP-1 e RANTES;

Avaliar a ativação células gliais através da co-localização com marcadores de mudança de perfil inflamatório, iNOS e Arginase;

Avaliar a expressão do marcador de estresse nitrosativo, 3-nitrotirosina

Avaliar a expressão de BDNF, importante na formação e consolidação de memória.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adukpo S, Kusi KA, Ofori MF, Tetteh JKA, Amoako-Sakyi D, Goka BQ, Adjei GO, Edoh DA, Akanmori BD, Gyan BA, Dodoo D. **High Plasma Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Are Associated with Cerebral Malaria.** *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e84181
- Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. **Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria.** *J Immunol.* 2013 May 1; 190(9):4685-91.
- Al Yaman FM, Mokela D, Genton B, Rockett KA, Alpers MP, Clark IA. **Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 May-Jun; 90(3):270-3
- Annane D, Sharshar T. **Cognitive decline after sepsis.** *Lancet Respir Med.* 2015
- Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL. **Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression.** *J Exp Med.* 1996 Aug 1; 184(2):557-67.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. **The pathophysiology of vivax malaria.** *Trends Parasitol.* 2009 May; 25 (5):220-7
- Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. **Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi.** *Mediterr J. Hematol. Infect. Dis.* 2012.4:e2012013
- Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Njua-Yafi C, Mugri RN, Ngwai AN, Rockett KA, Mbunwe E, Besingi RN, Clark TG, Dominic P, Kwiatkowski DP, Achidi EA. **Association of Cytokine and Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms with Severe Malaria in Three Regions of Cameroon.** *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e81071

- Asensio VC, Oshima H, Falanga PB. **Plasmodium berghei: is nitric oxide involved in the pathogenesis of the mouse cerebral malaria?** *Exp. Parasitol.* 1993 Aug; 77(1):111-7.
- Bangirana P, Musisi S, Boivin MJ, Ehnvall A, John CC, Bergemann TL, Allebeck P. **Malaria with neurological involvement in Ugandan children: effect on cognitive ability, academic achievement and behaviour.** *Malaria Journal* 2011, 10:334
- Basir R, Rahiman SSF, Hasballah K, Chong WC, Talib H, Yam MF, Jabbarzare M, Tie TH, Othman F., Moklas MAM, Abdullah WO, Ahmad Z. **Plasmodium berghei ANKA Infection in ICR Mice as a Model of Cerebral Malaria.** *Iranian J. Parasitol: Vol. 7, No.4, 2012, pp. 62-74*
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. **Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions.** *International Journal for Parasitology* 34 (2004) 163–189
- Bernhardi R, Bernhardi LE and Eugénín J. **Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration.** *Frontiers in Aging Neuroscience.* June 2015, Volume 7, Article 124
- Bogdan C. **Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update.** *Trends Immunol.* 2015.
- Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM and John CC. 2007. **Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study.** *Pediatrics.* 119: e360-366.
- Bonin JS, Silva WC, Bevilaquia LRM, Medina JH, Izquierdo I and Cammarota M. **On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation e reconsolidação of spatial memory.** *Neuroscience* 147 (2007) 37–45
- Boutlis CS, Lagog M, Chaisavaneeyakorn S, Misukonis MA, Bockarie MJ, Mgone C, Wang Z, Morahan G, Weinberg JB, Udhayakumar V, Anstey NM. **Plasma Interleukin-12 in Malaria-Tolerant Papua New Guineans: Inverse Correlation with Plasmodium falciparum Parasitemia and Peripheral Blood Mononuclear Cell Nitric Oxide Synthase Activity.** *INFECTIO AND IMMUNITY, Nov. 2003, p. 6354–6357*

- Brown GC. **Nitric oxide and neuronal death.** *Nitric Oxide.* 2010 Nov 1; 23(3):153-65.
- Brunet LR. **Nitric oxide in parasitic infections.** *International Immunopharmacology* 1 (2001) 1457–1467
- Cabrales P1, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJ. **Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology.** *J Infect Dis.* 2011 May 15; 203(10):1454-63
- Calderaro A, Piccolo P, Gorrini C, Rossi R, Montecchini S, Dell'Anna ML, Conto F, Medici MC, Chezzi C, Arcangeletti MC. **Accurate identification of the six human *Plasmodium spp.* causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*.** *Malaria Journal* 2013, 12:321
- Capuccini B, Lin J, Talavera-López C, Khan SM, Sodenkamp J, Spaccapelo L and Langhorne J. **Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response during experimental cerebral malaria.** *Sci Rep.* 2016 Dec 19; 6:39258.
- Carter JA, Neville BJR, Newton CRJC. **Neuro-cognitive impairment following acquired central nervous system infections in childhood: a systematic review.** *Brain Research Reviews* 43 (2003) 57–69
- Carvalho LJM, Moreira AS, Daniel-Ribeiro CT and Martins YC. **Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Aug; 109(5): 577–588.
- Center for Disease Control and Prevention. The History of Malaria, an Ancient Disease, 2015. <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html>
- Cherry JD, Olschowka JA and O'Banion MK. **Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed.** *J Neuroinflammation.* 2014 Jun 3; 11:98
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B. **Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro.** *Brain Behav Immun.* 2013 Aug; 32:70-85

- Clark IA, Awburn MM, Whitten RO, Harper CG, Liomba NG, Molyneux ME, Taylor TE. **Tissue distribution of migration inhibitory factor and inducible nitric oxide synthase in falciparum malaria and sepsis in African children.** *Malaria J.* 2003 Apr 8; 2: 6. Epub 2003 Apr 8
- Clark IA, Budd AC, Alleva LM, and Cowden WB. **Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release.** *Malar J.* 2006; 5: 85
- Coban C, Ishii KJ, Akira S. **Immune interventions of human diseases through toll-like receptors.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 655: 63-80
- Cobb CA and Cole MP. **Oxidative and Nitrate Stress in Neurodegeneration.** *Neurobiol Dis.* 2015 Dec; 84: 4-21.
- Combes V, Guillemin GJ, Chan-Ling T, Hunt NH, Grau GE. **The crossroads of toll-like receptors.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 655: 63-80
- Costa LG. **The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides.** *Handb Clin Neurol.* 2015; 131:135-48.
- Cox FE. **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** *Parasit. Vectors* 2010.3:5. *Parasitology.* 2016 Sep 15:1-15
- Cox FE. **The Golden Age of parasitology-1875-1925: the Scottish contributions.** *Parasitology.* 2016 Sep 15:1-15
- Cowman AF, Healer J, Marapana D and Marsh K. **Malaria: Biology and Disease.** *Cell* 167, October 20, 2016.
- Craig AG, Khairul MFM, Patil PR. **Cytoadherence and Severe Malaria.** *Malays J. Med. Sci.* Apr-Jun 2012; 19(2): 5-18
- Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, Turner G, Langhorne J. **The role of animal models for research on severe malaria.** *PLoS Pathog.* 2012 Feb; 8(2):e1002401
- Cromer D, Best SE, Engwerda C, Haque A, Davenport M. **Where Have All the Parasites Gone? Modelling Early Malaria Parasite Sequestration Dynamics.** *PLoS ONE* 8(2): e55961, 2013.
- Cunha CB. and Cunha BA. **Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler.** *J. Vector Borne Dis.* 2008.45:194-9.
- Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, Desruisseaux MS. **Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial**

- treatment in murine cerebral malaria.** *Microbes Infect.* 2010 Dec; 12 (14-15):1198-207
- Davies MJ. **Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention.** *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011 Jan; 48(1):8-19
- Delhaye J, Jenkins T, and Christe P. **Plasmodium infection and oxidative status in breeding great tits, *Parus major*.** *Malar J.* 2016; 15: 531
- Dellamea BS, Leitão CB, Friedman R, Canani LH. **Nitric oxide system and diabetic nephropathy.** *Diabetol Metab Syndr.* 2014 Feb 12; 6(1):17
- Desruisseaux MS, Gulinello M, Smith DN, Lee SC, Tsuji M, Weiss LM, Spray DC, Tanowitz HB. **Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA.** *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197:1621–7
- Dhangadamajhi G, Mohapatra BN, Kar SK, Ranjit M. **Genetic variation in neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene and susceptibility to cerebral malaria in Indian adults.** *Infection, Genetics and Evolution* 9 (2009) 908–911
- Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, Kamiza S, Molyneux M, Taylor TE. **The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children.** *The American Journal of Pathology, Vol. 178, No. 5, May 2011*
- Dreschel AD, Estévez AG, Barbeito L and Beckman JS. **Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS.** *Neurotox Res.* 2012 November; 22(4): 251–264.
- Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL. **Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 18; 104(38):15081-6.
- Eisenhut M. **Vasospasm in cerebral inflammation.** *Int J Inflam.* 2014; 2014:509707
- Fatih FA, Siner A, Ahmed A, Woon LC, Craig AG, Singh B, Krishna S, Cox-Singh J. **Cytoadherence and virulence - the case of *Plasmodium knowlesi* malaria.** *Malaria Journal* 11:33, 2012

- Favre N, Ryffel B, Rudin W. **Parasite killing in murine malaria does not require nitric oxide production.** *Parasitology.* 1999 (a) Feb;118 (Pt 2):139-43
- Favre N, Ryffel B, Rudin W. **The development of murine cerebral malaria does not require nitric oxide production.** *Parasitology.* 1999 (b) Feb; 118 (Pt 2):135-8.
- Fernando SD, Rodrigo C, Rajapakse S. **The 'hidden' burden of malaria: cognitive impairment following infection.** *Malaria Journal* 2010, 9:366
- Förstermann U and Sessa WC. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** *European Heart Journal* (2012) 33, 829–837
- Franklin BS, Ishizakac ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, Zheng W, Ataíde MA, Oliveira RB, Golenbock DT, Gazzinel RT. **Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malária.** *PNAS* | March 1, 2011 | vol. 108 | no. 9 | 3689–3694
- Franklin BS, Parrocheb P, Ataídea MA, Lauwb F, Roperta C, Oliveira RBO, Pereira D, Tadaç MS, Nogueira P, Silva LHP, Bjorkbackad H, Golenbocka DT, Gazzinellia RT. **Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function.** *PNAS*, April 7, 2009 vol. 106 no. 14 5789–5794
- Fujikawa DG. **The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury.** *Comput Struct Biotechnol J.* 2015 Mar 28; 13:212-21
- Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. **Innate sensing of malaria parasites.** *Nat Rev Immunol.* 2014 Nov; 14(11):744-57
- Genestra M. **Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants.** *Cell Signal.* 2007 Sep; 19(9):1807-19.
- Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde HC. **Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria.** *Nat. Med.*, 2006, 12:1417-1422
- Griffing SM, Taulil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. **A historical perspective on malaria control in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Sep; 110 (6):701-18

- Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Menard R, Amino R. **Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2010.107:18640-5
- Guimarães RM, Asmus CI, Meyer A. **DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health.** *Cad Saude Publica.* 2007 Dec; 23(12):2835-44
- Gun SY, Claser C, Tan KSW, and Rénia L . **Interferons and Interferon Regulatory Factors in Malaria.** *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 243713.
- Gupta H, Dhunpath P, Bhatt AN, Satyamoorthy K, Umakanth S. **Cerebral malaria in a man with Plasmodium vivax mono-infection: a case report.** *Trop Doct.* 2016 Oct; 46(4):241-245. Epub 2016 Jan 8
- Habib S and Ali A. **Biochemistry of Nitric Oxide.** *Ind J Clin Biochem* (Jan-Mar 2011) 26(1):3–17
- Hansen DS. **Inflammatory Responses Associated with the Induction of Cerebral Malaria: Lessons from Experimental Murine Models.** *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): e1003045
- Hawkes M, Opoka RO, Namasopo S, Miller C, Conroy AL, Serghides L, Kim H, Thampi N, Liles WC, John CC and Kain KC. **NITRIC OXIDE FOR THE ADJUNCTIVE TREATMENT OF SEVERE MALARIA: HYPOTHESIS AND RATIONALE.** *Med Hypotheses.* 2011 Sep; 77(3): 437–444.
- Hemingway J. **The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 May 12; 369(1645):20130431
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. **Innate immune activation in neurodegenerative disease.** *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul; 14(7):463-77
- Hernandes MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, Castro-Faria-Neto HC, Cunha FQ, Britto LR, Bozza FA. **The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis.** *J Neuroinflammation.* 2014 Feb 27; 11:36.

- Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rénia L. **Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria.** *Semin Immunopathol.* 2015 May; 37(3):221-31
- Hrabarova E, Juranek I, Soltes L. **Pro-oxidative effect of peroxynitrite regarding biological systems: a special focus on high-molar-mass hyaluronan degradation.** *Gen. Physiol. Biophys.* (2011), 30, 223–238
- Hugo J, Ganguli M. **Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment.** *Clin Geriatr Med.* 2014 Aug; 30(3):421-42.
- Hunt NH, Ball HJ, Hansen AM, Khaw LT, Guo J, Bakmiwewa S, Mitchell AJ, Combes V, Grau GE. **Cerebral malaria: gamma-interferon redux.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Aug 15; 4:113
- Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ. **Cerebral Malaria; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies for Improved Neuro-Cognitive Outcome.** *Pediatr. Res.* 2010; 68(4): 267–274. (A)
- Idro R, Kakooza-Mwesige A, Balyejjussa S, Mirembe G, Mugasha C, Tugumisirize J, Byarugaba J. **Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children.** *BMC Research Notes* 2010, 3: 104 (B)
- Idro R, Kakooza-Mwesige A, Asea B, Ssebyala K, Bangirana P, Opoka RO, Lubowa SK, Semrud-Clikeman M, John CC, Nalugya J. **Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort.** *Malar J.* 2016 Mar 31; 15(1):184.
- Ioannidis LJ, Nie CQ, Hansen DS. **The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye.** *Parasitology.* 2014 Apr; 141(5):602-13
- Isah MB and Ibrahim MA. **The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review.** *Parasitol Res* (2014) 113:801–809
- Islam BU, Habib S, Ahmad P, Allarakha S, Moinuddin, Ali A. **Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP).** *Indian J Clin Biochem.* 2015 Oct; 30(4):368-85. doi: 10.1007/s12291-014-0475-8. Epub 2015 Jan 20.

- Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K. **Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS.** *Rev Neurosci.* 2016 Jul 1;27(5):481-90.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. **Mechanisms for memory types differ.** *Nature* 393:635-6, 1998
- Izquierdo I. **Memória.** *Artimed editor (2002). Reimpressão, 2008*
- Izquierdo I, Cammarota M, Da Silva WC, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Mello P, Beneti F, Costa JC, Medina JH. **The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências (2008) 80(1): 115-127*
- Izquierdo I, Medina JH. **Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures.** *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY* 68, 285–316 (1997).
- Izquierdo IA, Myskiw JC, Benetti F, Furini CRG. **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes.** *REVISTA USP/São Paulo, n. 98, p. 9-16 • JUNHO/JULHO/agosto 2013.*
- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. **Fear Memory.** *Physiol Rev.* 2016 Apr; 96(2):695-750
- Janes JH, Wang CP, Levin-Edens E, Vigan-Womas I, Guillotte M, Melcher M, Mercereau-Puijalon O, Smith JD. **Investigating the host binding signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 protein family.** *PLoS Pathog* 2011.7:e10020.
- John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, Wu B, Boivin MJ. **Cerebral Malaria in Children Is Associated With Long-term Cognitive Impairment.** *Pediatrics* 2008; 122; e 92
- Kayano AC, Dos-Santos JC, Bastos MF, Carvalho LJ, Aliberti J, Costa FT. **Pathophysiological Mechanisms in Gaseous Therapies for Severe Malaria.** *Infect Immun.* 2016 Mar 24; 84(4):874-82
- Katche C, Cammarota M, Medina JH. **Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage.** *Neurobiol Learn Mem.* 2013 Nov; 106:40-7

- Kaushik JS, Gomber S, Dewan P. **Clinical and epidemiological profiles of severe malaria in children from Delhi, India.** *J. Health Popul. Nutr.* 2012 Mar; 30(1):113-6
- Khazan M and Mehdi Hdayati M. **The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases.** *Scimetr.* 2015 January; 3(1): e20987
- Kihara M, Carter JA, Holding PA, Vargha-Khadem F, Scott RC, Idro R, Fegan GW, Haan M, Neville BGR, Newton CRJC. **Impaired everyday memory associated with encephalopathy of severe malaria: the role of seizures and hippocampal damage.** *Malaria Journal* 2009, 8:273
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. **The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases.** *Exp Neurobiol.* 2015 Dec; 24(4):325-40
- Kinra P, Dutta V. **Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria.** *Trop Biomed.* 2013 Dec; 30(4):645-53
- Kublin JG, Mikolajczak SA, Sack BK, Fishbaugher ME, Seilie A, Shelton L, VonGoedert T, Firat M, Magee S, Fritzen E, Betz W, Kain HS, Dankwa DA, Steel RW, Vaughan AM, Noah Sather D, Murphy SC, Kappe SH. **Complete attenuation of genetically engineered Plasmodium falciparum sporozoites in human subjects.** *Sci Transl Med.* 2017 Jan 4; 9(371).
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. **Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection** *Prog Neurobiol.* 2014 Apr; 115: 157-88.
- Lee KM and MacLean AG. **New advances on glial activation in health and disease.** *World J Virol* 2015 May 12; 4(2): 42-55
- Li LL, Ginet V, Liu X, Vergun O, Tuittila M, Mathieu M, Bonny C, Puyal J, Truttmann AC, Courtney MJ. **The nNOS-p38MAPK pathway is mediated by NOS1AP during neuronal death.** *J Neurosci.* 2013 May 8; 33(19):8185-201.
- Liu ZW, Zhang T, Yang Z. **Involvement of nitric oxide in spatial memory deficits in status epilepticus rats.** *Neurochem Res.* 2007 Nov; 32(11):1875-83.
- Ljubisavljevic S and Stojanovic I. **Neuroinflammation and demyelination from the point of nitrosative stress as a new target for neuroprotection.** *Rev. Neurosci.* 2015; 26(1): 49–73

- McQueen PG, Williamson KC, and McKenzie FE. **Host immune constraints on malaria transmission: insights from population biology of within-host parasites.** *Malar J.* 2013; 12: 206.
- Maiti P, Singh SB, Ilavazhagan G. **Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain.** *Acta Histochem.* 2009 May 8
- Majori G. **Short history of malaria and its eradication in Italy with short notes on the fight against the infection in the mediterranean basin.** *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012.4:e2012016.
- Maneerat Y, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Jones M, Wilairatana P, Pongponratn E Turner GD, Udomsangpetch R. **Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria.** *Histopathology.* 2000 Sep; 37(3):269-77.
- Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan C A. **Monocyte activation and cytokine production in Malawian children presenting with *P. falciparum* malaria** *Parasite Immunol.* 2016 May; 38(5): 317-25.
- Mander P and Brown CG. **Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration.** *Journal of Neuroinflammation* 2005, 2:20
- Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BP, Andrade BG, Souza TM, Souza D O, Daniel-Ribeiro CT. **Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol.** *Malar J.* 2010 Mar 24; 9:85.
- Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJM. **Efficacy of Different Nitric Oxide-Based Strategies in Preventing Experimental Cerebral Malaria by *Plasmodium berghei* ANKA.** *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32048.
- Matuschewski K. **Murine infection models for vaccine development: The malaria example.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9:3, 450–456; 20 13 Landes Bioscience.
- Medana IM, Hunt NH, Chan-Ling T. **Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria.** *Glia.* 1997 Feb;19(2):91-103.

- Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Gómez PY. **Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy** *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:293689
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 2002.415:673-9.
- Miller LH, Ackerman HC, Xin-zhuan Su XZ, and Wellems TE. **Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments.** *Nat Med.* 2013 Feb; 19(2): 156–167.
- Mishra SK e Newton CRJC. **Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malária.** *Nat. Rev. Neurol.* 2009 April; 5(4): 189–198.
- Mizuno K and Giese KP. **Hippocampus-Dependent Memory Formation: Do Memory Type-Specific Mechanisms Exist?** *J. Pharmacol. Sci* 98, 191 – 197 (2005)
- Molina-Cruz A, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G. **Reactive Oxygen Species Modulate Anopheles gambiae Immunity against Bacteria and Plasmodium.** *J. Biol. Chem.* 2008, 283:3217-3223
- Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, Pollok K, Mothes R, Viohl L, Radbruch M, Gerhard J, Bellmann-Strobl J, Behrens J, Infante-Duarte C, Mähler A, Boschmann M, Rinnenthal JL, Füchtemeier M, Herz J, Pache FC, Bardua M, Priller J, Hauser AE, Paul F, Niesner R, and Radbruch H. **Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation.** *Acta Neuropathol.* 2015; 130(6): 799–814.
- Mung'ala-Odera V, Snow RW, Newton CRJC. **The Burden of the Neurocognitive Impairment Associate with Plasmodium falciparum Malaria in Sub-Saharan Africa.** *J. Trop. Med. Hyg.,* 71(Suppl 2), 2004, pp. 64–70
- Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, and Stewart VA. **Malaria Diagnostics in Clinical Trials.** *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Nov 6; 89(5): 824–839
- Nahrevanian H. **Immune Effector Mechanisms of the Nitric Oxide Pathway in Impairment Associate with Plasmodium falciparum Malaria in Sub-Saharan Africa.** *J. Trop. Med. Hyg.,* 71(Suppl 2), 2004, pp. 64–70

- Oates JC e Gilkeson GS. **The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus.** *Clinical Immunology* (2006) 121, 243—250
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. **Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991
- Okumu FO, Moore SJ. **Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future.** *Malar J.* 2011 Jul 28; 10:208.
- Oluwayemi IO, Brown BJ, Oyedeji OA, Oluwayemi MA. **Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria.** *Pan African Medical Journal.* 2013; 15:88.
- Ong PK, Melchior B, Martins YC, Hofer A, Orjuela-Sa´nchez P, Cabrales P, Zanini, G.M.,Frangos,J.M., Carvalho,L.J.M. **Nitric Oxide Synthase Dysfunction Contributes to Impaired Cerebroarteriolar Reactivity in Experimental Cerebral Malaria.** *PLoS Pathog,* 2013, 9(6): e1003444
- Organizaao Mundial de Sa´ude. **World Malaria Report.** *Global Malaria Programme World Health Organization,* 2016
- Pasini EM, Zeeman AM, Voorberg-VAN DER Wel A, Kocken CH. **Plasmodium knowlesi: a relevant, versatile experimental malaria model.** *Parasitology.* 2016 Dec 12:1-15
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev.* 2007 Jan; 87(1):315-424. (A)
- Pacher P, Szabó C. **Role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors.** *Cardiovasc Drug Rev.* 2007 Fall; 25(3):235-60. (B)
- Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD. **Oxidative Stress in Malaria.** *Int. J.Mol. Sci.* 2012, 13, 16346-16372
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. **Severe malarial-anemia: innate immunity and pathogenesis.** *Int. J. Biol. Sci.* 2011. 7(9):1427-42

- Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. **Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Ann NY Acad Sci.* 2003 Dec; 1010:582-586
- Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, Esiri MM, Day NPJ, White NJ, Turner GDH. **Sequestration and Microvascular Congestion Are Associated With Coma in Human Cerebral Malaria.** *JID* 2012;205 (15 February). 663
- Pradhan V and Ghosh K. **Immunological disturbances associated with malarial infection.** *J Parasit Dis (Jan-June 2013)* 37(1):11–15
- Predonzani A, Cali B, Agnellini AH, Molon B. **Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide.** *World J Exp Med.* 2015 May 20; 5(2):64-76
- Prolo C, Álvarez MN, and Radi R. **Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens.** *Biofactors.* 2014 March; 40(2): 215–225
- Punsawad C, Maneerat Y, Chaisri U, Nantavisai K, Viriyavejakul P. **Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and in extravascular leukocytes of fatal cerebral malaria.** *Malar J.* 2013 Jul 26; 12:260.
- Pukrittayakamee S, Tarning J, Jittamala P, Charunwatthana P, Lawpoolsri S, Lee SJ, Hanpithakpong W, Hanboonkunupakarn B, Day NP, Ashley EA, White NJ. **Pharmacokinetic interactions between primaquine and chloroquine.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun; 58(6):3354-9
- Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MVL, Valencia SH. **Malaria-related anaemia: a Latin American.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(Suppl. 1): 91-104, 2011*
- Rajasekaran K. **Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition.** *Pharmacol Biochem Behav.* 2005 Feb; 80(2):263-72.
- Radi R. **Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant.** *J. Biol. Chem.* 2013, 288:26464-26472.

- Rahimi BA, Thakkinstian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokeyindachai W. **Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900.** *Malar J.* 2014 Dec 8; 13:481
- Rahman MM. **Insecticide substitutes for DDT to control mosquitoes may be causes of several diseases.** *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013 Apr; 20(4):2064-9
- Ray RS, Katyal A. **Myeloperoxidase: Bridging the gap in neurodegeneration.** *Neurosci Biobehav Rev.* 2016
- Rénia L, Howland SW, Claser C, Gruner AC, Suwanarusk R, Teo TH, Russell B, Ng LFP. **Cerebral malária: Mysteries at the blood-brain barrier.** *Landes Bioscience,* 2012, 193–201
- Reis PA, Comim CM, Hermani FV, Silva BR, Barichello T, Sab IM, Frutuoso VS, Bozza PT, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC. **Cognitive impairment after cerebral malaria in chloroquine treated mice is reversed by antioxidant adjuvant therapy.** *PLoS Pathog.* 2010 Jun 24;6(6):e1000963
- Reis PA, Estado V, Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, Bozza PT, Bozza FA Tibiriçá EV, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC. **Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria.** *PLoS Pathog,* 2012,8(12): e1003099
- Reis PA, Alexandre PC, D'Avila JC, Siqueira LD, Antunes B, Estado V, Tibiriçá EV, Verdonk F, Sharshar T, Chrétien F, Castro-Faria-Neto HC, Bozza FA. **Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction.** *Brain Behav Immun.* 2017 Feb; 60:293-303
- Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM. **SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice.** *Neurosci Lett.* 2001 Jun 22;306(1-2):89-92
- Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. **Climate, environment and transmission of malaria.** *Infez Med.* 2016 Jun 1; 24(2):93104

- Sarkar S, Saha K, Das CS. **Three cases of ARDS: An emerging complication of Plasmodium vivax malaria.** *Lung India* 2010. 27:154-7
- Sahu U, Sahoo PK, Kar SK, Mohapatra BN, Ranjit M. **Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria** *Hum Immunol.* 2013 Jun; 74(6):713-21
- Sahu PK, Satpathi S, Behera PK, Mishra SK, Mohanty S, Wassmer SC. **Pathogenesis of cerebral malaria: new diagnostic tools, biomarkers, and therapeutic approaches.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2015 Oct 27; 5:75.
- Schumacher RF e Spinelli E. **Malaria in Children.** *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2012, 4(1): e2012073
- Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, Francis RC, Liles WC, Zapol WM, Kain KC. 2011. **Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria.** *PLoS One.* 6:e27714.
- Serghides L, McDonald CR, Lu Z, Friedel M, Cui C, Ho KT, Mount HTJ, Sled JG, Kain KC. **PPARY Agonists Improve Survival and Neurocognitive Outcomes in Experimental Cerebral Malaria and Induce Neuroprotective Pathways in Human Malaria.** *PLoS Pathog*, 2014, 10 (3): e1003980
- Shrivastava SK, Dalko E, Delcroix-Genete D, Herbert F, Cazenave PA, Pied S. **Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria.** *Glia.* 2017 Jan; 65(1):75-92.
- Singh R, Kumar R, Rana SK, Thakur B, Singh SPA. **Comparative Study of Clinical Profiles of Vivax and Falciparum Malaria in Children at a Tertiary Care Centre in Uttarakhand.** *J. Clin. Diagn. Res.*, 2013; 7(10): 2234–2237.
- Shastri A, Bonifati DM and Kishore U. **Innate Immunity and Neuroinflammation.** *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 342931.
- Shikani HJ, Freeman BD, Lisanti MP, Weiss LM, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. **Cerebral Malaria: We Have Come a Long Way.** *The American Journal of Pathology*, Vol. 181, No. 5, November 2012

- Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC. **Nitric oxide bioavailability in malaria.** *Review TRENDS in Parasitology Vol.21 N°9 September 2005*
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. **Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe?** *Mol Neurobiol.* 2016 Nov 26
- Sofroniew MV and Harry V. Vinters HV. **Astrocytes: biology and pathology.** *Acta Neurophatol.* 2010 Jan; 119(1): 7-35
- Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pea HO. **Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How can ROS Activate MAPK Pathways?** *J Signal Transduce.* 2011; 2011:792639.
- Souza MC, Padua TA and Henriques MG. **Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain.** *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 168937
- Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Hondo M, Miyakawa T, Yanagisawa M, Mieda M, Sakurai T. **Orexin Receptor-1 in the Locus Coeruleus Plays an Important Role in Cue-Dependent Fear Memory Consolidation.** *The Journal of Neuroscience, September 4, 2013 • 33(36):14549–14557 • 14549*
- Spanos JP, Hsu NJ and Jacobs M. **Microglia are crucial regulators of neuro-immunity during central nervous system tuberculosis.** *Front Cell Neurosci.* 2015 May 18; 9 :182
- Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. **Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia.** *Neuroscientist.* 2010 Aug; 16(4):435-52
- Storm J, Craig AG. **Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Jul 29; 4:100
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. 2007. **Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics.** *NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY* 6:8.
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. **Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis.** *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Apr; 25(4):485-92
- Sweatt JD. **Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances.** *J Neurochem.* 2016 Oct; 139 Suppl 2:179-199

- Tabrizian K, Najafi S, Belaran M, Hosseini-Sharifabad A, Azami K, Soodi M, Kazemi A, Kebriaeezadeh A, Sharifzadeh M. **Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-Recovered Ketamine Induced Anesthesia.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2011), 10 (4): 861-868
- Tanizaki R, Ujiie M, Kato Y, Iwagami M, Hashimoto A, Kutsuna S, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Kano S, Ohmagari N. **First case of *Plasmodium Knowlesi* infection in Japanese traveller return from Malaysia.** *Malaria Journal*. 2013; 12: 128.
- Taoufiq Z, Pino P, Dugas N, Conti M, Tefit M, Mazier D, Vouldoukis I. **Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against *Plasmodium falciparum*-induced oxidative stress.** *Molecular & Biochemical Parasitology* 150 (2006) 166–173
- Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, Ménard R, Amino R. **Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection.** *J Exp Med*. 2013 May 6; 210(5):905-15
- Thakur K and Zunt J. **Neurologic Parasitic Infections in Immigrants and Travelers.** *Semin. Neurol*. 2011; 31(3): 231–244
- Tronel C, Rochefort GY, Arlicot N, Bodard S, Chalon S, Antier D. **Oxidative Stress Is Related to the Deleterious Effects of Heme Oxygenase-1 in an *In Vivo* Neuroinflammatory Rat Model.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, Article ID 26493
- Turner JA, Ruscoe CN, Perrior TR. **Discovery to Development: Insecticides for Malaria Vector Control.** *Chimia (Aarau)*. 2016 Oct; 70(10):684-693
- Vinchi F e Tolosano E. **Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven endothelial dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis.** *Oxid. Med. Cell Longev*. 2013; 2013: 396527
- Vorhees CV and Williams MT. **Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents.** *ILAR J*. 2014; 55(2): 310–332.
- Vythilingam I. ***Plasmodium knowlesi* in humans: a review on the role of its vectors in Malaysia.** *Trop. Biomed.*, 2010; 27(1):1-12.

- Wah ST, Hananantachai H, Kerdpin U, Plabplueng C, Prachayasittikul V, Nuchnoi P. **Molecular basis of human cerebral malaria development.** *Trop Med Health.* 2016 Sep 27; 44:33
- Wang H, Peng RY. **Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity.** *Mil Med Res.* 2016 Aug 31; 3(1):26.
- Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. **Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease.** *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Aug; 29:66-71.
- Wassmer SC and Grau GE. **Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?** *Int J Parasitol.* 2016 Sep 23. pii: S0020-7519 (16)30210-7.
- Wiese L, Kurtzhals JA, Penkowa M. **Neuronal Apoptosis, Metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice.** *Exp. Neurol.* 200:216-26, 2006
- Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, and Colton CA. **Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response.** *J Leukoc Biol.* 2011 Jun; 89(6): 873–891.
- White MT, Verity R, Griffin JT, Asante KP, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Drakeley C, Gesase S, Lusingu J, Ansong D, Adjei S, Agbenyega T, Ogutu B, Otieno L, Otieno W, Agnandji ST, Lell B, Kremsner P, Hoffman I, Martinson F, Kamthunzu P, Tinto H, Valea I, Sorgho H, Oneko M, Otieno K, Hamel MJ, Salim N, Mtoro A, Abdulla S, Aide P, Sacarlal J, Aponte JJ, Njuguna P, Marsh K, Bejon P, Riley EM, and Ghani AC. **Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial.** *Lancet Infect Dis.* 2015 Dec; 15(12): 1450–1458.
- White NJ. **Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite.** *Clinical Infectious Disease* 2008; 46:172-3
- White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. **The murine cerebral malaria phenomenon.** *Trends Parasitol.* 2010 Jan; 26(1):11-5.
- Wu WW, Bryant DN, Dorsa DM, Adelman JP, Maylie J. **Ovarian Hormone Loss**

Impairs Excitatory Synaptic Transmission at Hippocampal CA3–CA1 Synapses. *The Journal of Neuroscience*, October 9, 2013 • 33(41):16158–16169

- Yeo TW1, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, Darcy CJ, Granger DL, Weinberg JB, Lopansri BK, Price RN, Duffull SB, Celermajer DS, Anstey NM. **Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria.** *J Exp Med.* 2007 Oct 29; 204(11):2693-704
- Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJ. **Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during Plasmodium berghei ANKA infection in mice.** *J. Neuroinflammation* 2011.8:66.
- Zhang ZW, Cheng J, Xu F, Yuan M, Du JB, Shang J, Wang Y, Du L, Li ZL, Yuan S. **Mammal Cells Double Their Total RNAs against Diabetes, Ischemia Reperfusion and Malaria-Induced Oxidative Stress.** *M O L. M E D.* 1 7 (5 - 6) 5 3 3 - 5 4 1, MAY- J U N E 2 0 1 1
- Zhao Q, Xie X, Fan Y, Zhang J, Jiang W, Wu X, Yan S, Chen Y, Peng C, You Z. **Phenotypic dysregulation of microglial activation in young offspring rats with maternal sleep deprivation-induced cognitive impairment.** *Sci Rep.* 2015 Apr 1; 5:9513.
- Zhuo M, Laitinen JT, Li XC, Hawkins RD. **On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long - term potentiation in the hippocampus.** *Learn Mem.* 1998 Nov-Dec; 5(6):467-80

