

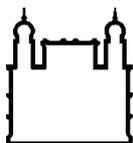
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EFEITO DOS ATIVADORES E ESTIMULADORES DA GUANILATO  
CICLASE SOLÚVEL NO FLUXO SANGUÍNEO E NA SOBREVIVÊNCIA NA  
MALÁRIA CEREBRAL MURINA POR *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA

MELINA PEDROSO MERLONE

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*MELINA PEDROSO MERLONE*

Efeito dos ativadores e estimuladores da guanilato ciclase solúvel no fluxo sanguíneo e na sobrevivência na malária cerebral murina por *Plasmodium berghei* ANKA

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

**Orientador:** Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2017

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

M565 Merlone, Melina Pedroso

Efeito dos ativadores e estimuladores da guanilato ciclase solúvel no fluxo sanguíneo e na sobrevivência na malária cerebral murina por *Plasmodium berghei* ANKA / Melina Pedroso Merlone. – Rio de Janeiro, 2017.

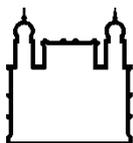
xiii, 93 f. : il. ; 30 cm.

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

Bibliografia: f. 78-92

1. Malária cerebral murina. 2. *Plasmodium berghei* ANKA. 3. Ativador de sGC. 4. Estimulador de sGC. 5. Vasoconstrição. 6. Terapia adjuvante.  
I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: MELINA PEDROSO MERLONE***

**EFEITO DOS ATIVADORES E ESTIMULADORES DA GUANILATO CICLASE  
SOLÚVEL NO FLUXO SANGUÍNEO E NA SOBREVIVÊNCIA NA MALÁRIA  
CEREBRAL MURINA POR *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho**

**Aprovada em: 30/03/2017**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho - *Presidente* (IOC/FIOCRUZ)**

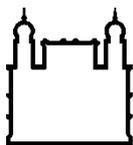
**Prof. Dr. Márcia Carvalho Vilela (UFJF/MG)**

**Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Vilella (UERJ/RJ)**

**Prof. Dr. Patrícia Alves Reis (IOC/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves (UFRJ/RJ)**

Rio de Janeiro, 30 de março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eliana e Marc, e irmãos, Renan e Sophia, pelo incentivo de realizar o mestrado, sempre apoiando todas as minhas escolhas.

Ao meu incrível orientador, Leonardo Carvalho, que aceitou me orientar após alguns meses do início do curso, mesmo eu desconhecendo as técnicas e o assunto, que me explicou todos os detalhes da malária cerebral e que acreditou no meu potencial. Agradeço a ele também pelos momentos de descontração, com longas conversas de assuntos totalmente aleatórios ou suas histórias de vida.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Malária, que sempre me ajudou em tudo que precisei e pelos momentos de risadas (acompanhados de cerveja ou um cafezinho). Gostaria de agradecer, principalmente, à doutoranda Aline Moreira, que me ensinou todas as técnicas com toda a paciência e dedicação, à Luciana Sousa, que me ensinou e realizou os experimentos de comportamento, sempre com muito bom humor e alegria contagiante, e ao Cesare Bianco, que salvou todas as minhas lâminas quando ficavam mal coradas e me ensinou a mexer nos aparelhos do laboratório. Ao Dr. Cláudio Tadeu e Dra. Maria de Fátima, por terem me recebido tão bem no laboratório, por terem acreditado em mim e me apoiado.

A toda equipe do Laboratório de Investigação Cardiovascular, por me receberem sempre muito bem e terem compartilhado todo o conhecimento da equipe comigo. Obrigada por me fazerem sentir em casa. Vocês são o melhor grupo de colaboração que eu podia ter tido! Agradeço principalmente à Dra. Vanessa Estato e Dr. Eduardo Tibiriçá por terem aceitado colaborar neste projeto.

À pós-graduação em Biologia Parasitária pela organização, atendimento, apoio e ótimas aulas, e ao CNPq pelo fomento.

Aos meus amigos eternos do “Povo”, Marina Moreira, Bernardo Martins, Fernando Damasco, Yasmin Avellar e Taila Figueiredo, por todos os momentos de alegrias, bobagens e comilanças. Principalmente à Marina, que está comigo

todos os dias ouvindo as minhas reclamações e histórias, me acompanhando a todo momento. Vocês são a família que escolhi! Amo vocês!

Ao meu namorado Daniel Bonolo pela paciência, compreensão, companheirismo e por ter realizado magnífica revisão neste trabalho. Aos meus amigos Louise Carvalho e Raoni Barata, pelas conversas intelectuais e gastronômicas, aos meus amigos da Família Hung Kung Fu, por todo o apoio e alegria. Aos animados aventureiros Vinícius Henriques, Lucas Almeida, Daniel Grosskopf e à União de Caminhantes e Escaladores Rio de Janeiro, por terem me proporcionado tantos momentos maravilhosos, com as melhores experiências de vida na montanha. Agradeço, finalmente, à minha turma de mestrado, a qual me acompanhou desde o começo e dividiu muitos momentos de alegria e tensão, fazendo com que a experiência nesse curso se tornasse incrível.

Obrigada a todos!!!

## FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

### INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DOS ATIVADORES E ESTIMULADORES DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL NO FLUXO SANGUÍNEO E NA SOBREVIDA NA MALÁRIA CEREBRAL MURINA POR *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Melina Pedroso Merlone

A malária cerebral (MC) é a maior causa de morte da infecção por *Plasmodium falciparum*. Camundongos susceptíveis infectados por *Plasmodium berghei* ANKA desenvolvem um quadro semelhante à MC humana, com microhemorragias, células aderidas ao endotélio, disfunção endotelial, hipoperfusão, baixa biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo cerebral. O presente estudo analisou o efeito do estimulador (riociguat) e ativador (cinaciguat) da enzima guanilato ciclase solúvel (enzima-alvo do NO que sinaliza para o processo de vasodilatação) sobre o fluxo sanguíneo cerebral, a permeabilidade da barreira hematoencefálica, a sobrevida e dano cognitivo em animais com MC murina. As intervenções ocorreram no 6º dia de infecção, quando os animais infectados apresentaram sinais clínicos da MC. Os animais foram tratados com riociguat e artemeter, cinaciguat e artemeter ou veículo e artemeter. Nos experimentos de fluxo sanguíneo cerebral, analisados por meio do *Laser Speckle* com Contraste de Imagem, os animais tratados com riociguat e artemeter apresentaram aumento do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora e 6 horas do tratamento, ao passo que em animais tratados com veículo e artemeter ocorreu aumento de fluxo sanguíneo com 1 hora mas não com 6 horas. Animais tratados com cinaciguat e artemeter não mostraram aumento de fluxo sanguíneo. O tratamento dos animais com artemeter, em combinação com riociguat, cinaciguat ou veículo, não alterou os níveis de permeabilidade da barreira hematoencefálica 6 horas após os respectivos tratamentos. Para analisar a sobrevida, os animais com MC foram tratados por 5 dias consecutivos com artemeter, sendo que nos dois primeiros também receberam uma dose de riociguat ou veículo. O tratamento com riociguat não modificou a sobrevida em relação ao tratamento com veículo. Os animais tratados que se recuperaram da MC, tratados com riociguat ou veículo, apresentaram desempenho em testes comportamentais semelhante àquele demonstrado por animais controles não infectados, sugerindo que a síndrome neurológica não provocou dano cognitivo. Concluiu-se que o riociguat é capaz de aumentar de fluxo sanguíneo cerebral de forma sustentada nas primeiras horas de tratamento, mas não causou benefícios na permeabilidade da barreira hematoencefálica, na sobrevida e na cognição, e que o cinaciguat não mostrou efeito benéfico em nenhum dos parâmetros analisados.

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

EFFECT OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE ACTIVATOR AND STIMULATOR ON  
BLOOD FLOW AND SURVIVAL IN MURINE CEREBRAL MALARIA BY  
*PLASMODIUM BERGHEI* ANKA

**ABSTRACT**

**MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY**

**Melina Pedroso Merlone**

Cerebral malaria (CM) is the major cause of death resulting from *Plasmodium falciparum* infection. Susceptible mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA develop a neurological syndrome similar to human CM, with brain microhemorrhages, blood cells adherent to the endothelium, endothelial dysfunction, hypoperfusion, low nitric oxide (NO) bioavailability, vasoconstriction and decreased cerebral blood flow. The present study analyzed the effect of the stimulator (riociguat) and activator (cinaciguat) of soluble guanylate cyclase (the NO target enzyme that signals for the vasodilation process) on cerebral blood flow, permeability of the blood-brain barrier, survival and cognitive impairment in animals with murine CM. The interventions were given on the 6th day of infection, when the infected animals showed clinical signs of CM. The animals were treated with riociguat and artemether, cinaciguat and artemether or vehicle and artemether. In Laser Speckle with Contrast Imaging experiments, animals treated with riociguat and artemether showed increased cerebral blood flow after 1 hour and 6 hours of treatment, whereas animals treated with vehicle and artemether occurred increased blood flow with 1 hour but not 6 hours. Animals treated with cinaciguat and artemether showed no increase in blood flow. Animals with CM showed increased permeability of the blood brain barrier to Evans blue, and artemether, in combination with either riociguat, cinaciguat or vehicle, did not alter the permeability levels of the blood-brain barrier 6 hours after the respective treatments. In order to analyze the effect on survival, animals with CM were treated for 5 consecutive days with artemether, and in the first two also received a dose of riociguat or vehicle. Treatment with riociguat did not modify survival over vehicle treatment. Animals that recovered from CM, treated with riociguat or vehicle, showed performance in behavioral tests similar to that demonstrated by uninfected control animals, suggesting that the neurological syndrome did not cause cognitive damage. It is concluded that riociguat is capable of increasing cerebral blood flow in a sustainable fashion in the first few hours of treatment, but it does not confer benefits on the permeability of the blood-brain barrier or survival or cognition, and cinaciguat showed no beneficial effect in any of the analyzed parameters.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Malária: aspectos gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Malária cerebral</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Papel do óxido nítrico na vasoconstrição na malária cerebral.....	9
<b>1.3 Modelo de malária cerebral experimental</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Contribuições do nosso grupo para o entendimento da disfunção vascular na MCE .....	19
<b>1.4 Atuação dos ativadores e estimuladores da sGC na vasodilatação</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 Justificativa</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6 Hipótese do trabalho</b> .....	<b>28</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Parasito e infecção</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 Drogas testadas</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 Medidas do fluxo sanguíneo cerebral pelo <i>Laser Speckle</i> com Contraste de Imagem (LSCI)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5 Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6 Ensaio de sobrevivência</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7 Testes de comportamento</b> .....	<b>38</b>
3.7.1 Teste do campo aberto .....	38
3.7.2 Teste de reconhecimento de objetos .....	40
3.7.3 Teste de esQUIVA inibitória .....	42

3.8	Análise estatística .....	43
4	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
4.1	<b>Fluxo sanguíneo cerebral .....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE e controles não infectados .....	46
4.1.2	Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter e riociguat .....	48
4.1.1	Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter .....	52
4.1.1	Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter e cinaciguat .....	53
4.2	<b>Permeabilidade da barreira hematoencefálica.....</b>	<b>56</b>
4.3	<b>Ensaio de sobrevivência.....</b>	<b>58</b>
4.4	<b>Testes de comportamento .....</b>	<b>59</b>
4.4.1	Campo aberto .....	59
4.4.2	Reconhecimento de objetos .....	61
4.4.3	Esquiva inibitória.....	63
5	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
6	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
8	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>93</b>
	<b>APÊNDICE A – LICENÇA CEUA</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> .....	2
Figura 1.2 – Mecanismos catalíticos e estrutura da NOS funcional .....	10
Figura 1.3 – Mecanismos para a formação de NO e vasodilatação .....	13
Figura 1.4 – Microvasos cerebrais de camundongos C57BL/6 .....	18
Figura 1.5 – Ação dos estimuladores e ativadores da sGC.....	23
Figura 1.6 – Estrutura química do riociguat e cinaciguat .....	25
Figura 3.1 – Mensuração do fluxo sanguíneo cerebral pelo LSCI.....	33
Figura 3.2 – Experimento com azul de Evans para análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica.....	36
Figura 3.3 – Teste do campo aberto pelo programa Any-maze™ .....	40
Figura 3.4 – Sessão teste do reconhecimento de objetos.....	41
Figura 3.5 – Teste de esquiva inibitória.....	43
Figura 4.1 – Fluxo sanguíneo cerebral de animal não infectado.....	46
Figura 4.2 – Fluxo sanguíneo cerebral de um animal infectado com MCE.....	47
Figura 4.3 – Fluxo sanguíneo cerebral de animais não infectados e infectados não tratados .....	48
Figura 4.4 – Fluxo sanguíneo cerebral antes e após 1 hora de tratamento com riociguat + artemeter .....	49,50
Figura 4.5 – Fluxo sanguíneo cerebral 6 horas após o tratamento nos grupos tratados com riociguat + artemeter e veículo + artemeter.....	51
Figura 4.6 – Efeito do artemeter no fluxo sanguíneo cerebral após uma hora... ..	52,53
Figura 4.7 – Fluxo sanguíneo cerebral 1 hora após o tratamento com cinaciguat.....	54,55
Figura 4.8 – Fluxo sanguíneo cerebral após 6 horas de tratamento com cinaciguat e veículo .....	56
Figura 4.9 – Concentração (µg/mL) do corante azul de Evans no cérebro.....	57
Figura 4.10 – Ensaio de sobrevivência.....	58,59

<b>Figura 4.11 – Avaliação da locomotividade, ansiedade e memória de habituação.. .....</b>	<b>60,61</b>
<b>Figura 4.12 – Tempo de exploração no teste de reconhecimento de objetos.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 4.13 – Tempo de descida na grade no teste de esquiva inibitória.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang-1	angiopoietina-1
Ang-2	angiopoietina-2
ADMA	dimetilarginina assimétrica
AsCH	ácido ascórbico
Art	artemeter
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterina
CaM	calmodulina
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
Cina	cinaciguat
CSA	condroitina sulfato A
CSP	proteína circunsporozoíta
CTEPH	hipertensão pulmonar tromboembólica crônica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPTA-NO	dipropilenotriamina NONOate
ELAM-1	molécula de adesão de leucócitos endotelial 1
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
GFP	proteína verde fluorescente
GSNO	glutathiona S-nitrosilada
GTP	guanosina trifosfato
HO-1	heme oxigenase-1
H/R	hipóxia/reoxigenação
ICAM-1	molécula de adesão intracelular 1
IF- $\gamma$	interferon-gama
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
i.p.	intraperitonetal

IP <sub>3</sub>	inositoltrifosfato
IRAG	receptor de IP <sub>3</sub> associado ao substrato de cGMP quinase
L-arg	L-arginina
L-cit	L-citrulina
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
LSCI	<i>Laser Speckle</i> com Contraste de Imagem
MC	malária cerebral
MCE	malária cerebral experimental
NADPH	nicodinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NOS	óxido nítrico sintase
PAH	hipertensão pulmonar arterial
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PfEMP1	proteína de membrana do eritrócito 1 de <i>P. falciparum</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PKG-1	proteína quinase G-1
PO <sub>2</sub>	pressão parcial de oxigênio
Rio	riociguat
s.c.	subcutânea
sCAMs	moléculas de adesão celular
sGC	guanilato ciclase solúvel
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
UPA	Unidade de perfusão arbitrária
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1
WPBs	corpos de Weibel-Palade

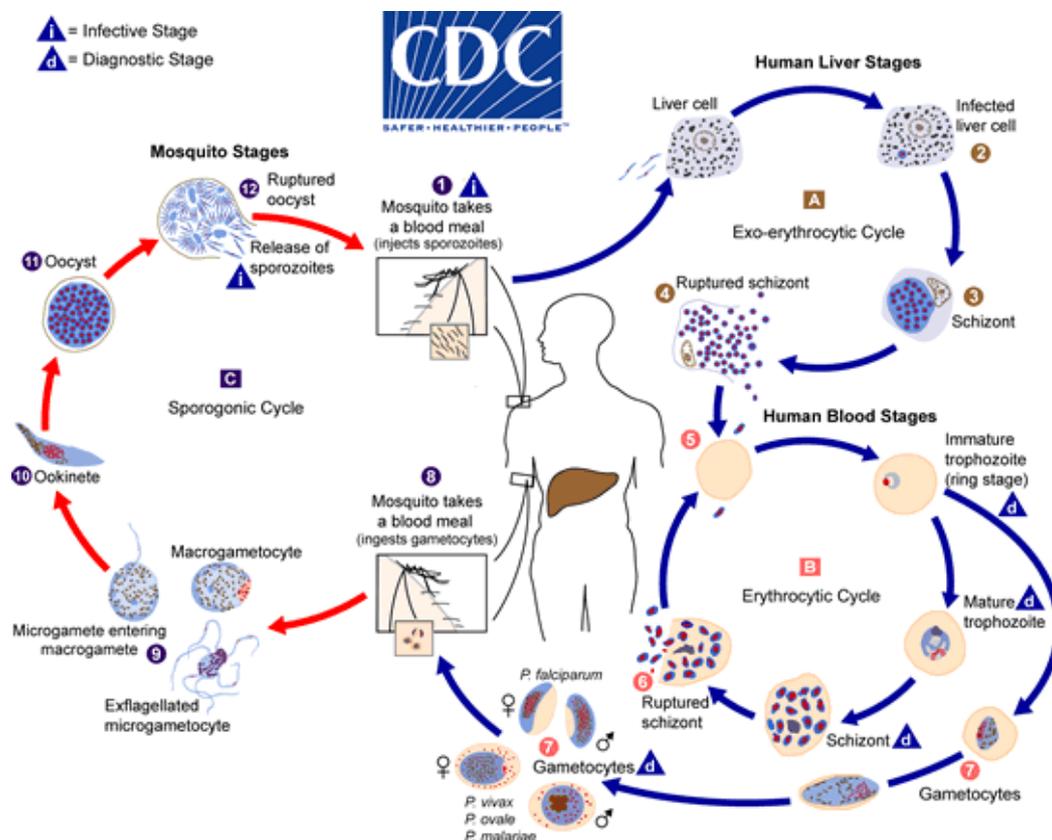
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária: aspectos gerais

A malária é uma doença causada por parasitas unicelulares do gênero *Plasmodium*, filo Apicomplexa [1]. Cinco espécies podem causar a doença no homem: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knolewsi*, sendo transmitidos de pessoa a pessoa por meio da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os sintomas iniciais da malária costumam se manifestar com cefaleia, mal estar, tonturas, náuseas, mialgia e cansaço, evoluindo para os sintomas clássicos, que são os calafrios, sudorese intensa, rubor e acessos febris com intervalos de 24, 48 ou 72 horas, variando com a espécie de plasmódio e com seu ciclo de infecção e destruição dos eritrócitos [2].

O plasmódio possui um ciclo no vertebrado, seu hospedeiro intermediário, chamado de esquizônico ou assexuado, e um no hospedeiro definitivo, o vetor, denominado ciclo esporogônico ou sexuado [3]. Dentro do homem este parasita ainda possui dois ciclos, denominados exoeritrocítico e eritrocítico (figura 1.1). O ciclo exoeritrocítico se inicia quando a fêmea anofelina pica o humano e os esporozoítos são injetados juntamente com a saliva do vetor, atingindo a derme e migrando para os vasos sanguíneos dentro de alguns minutos ou poucas horas (figura 1.1, 1) [4,5]. Os que atingem a corrente sanguínea migram até o fígado, onde invadem as células hepáticas por meio do reconhecimento das moléculas de adesão da proteína circunsporozoíta (CSP) com as moléculas sulfatadas da membrana dos hepatócitos (figura 1.1, 2). Após a invasão, os parasitas se desenvolvem por esquizogonia, originando os esquizontes teciduais que evoluem para os merozoítos (figura 1.1, 3). No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, parte dos parasitas pode se manter no hepatócito sob a forma de hipnozoíta, o que permite as recaídas tardias [2]. Ao fim da esquizogonia tecidual, o hepatócito se rompe, liberando milhares de merozoítos (figura 1.1, 4) que vão penetrar nos eritrócitos, dando início à fase eritrocítica (figura 1.1, 5). Dentro das hemácias os merozoítos se transformam em trofozoítos e, posteriormente, evoluem para

esquizontes, os quais rompem as hemácias, liberando merozoítos que vão invadir novas células sanguíneas (figura 1.1, 6). O processo de destruição das hemácias com liberação dos merozoítos, juntamente com os fragmentos celulares e resíduos metabólicos, causa os calafrios e a febre [1]. Alguns parasitos se transformam em gametócitos no interior das hemácias, produzindo gametas separadamente (microgametócito, masculino e macrogametócito, feminino) (figura 1.1, 7) e, quando o mosquito realiza o repasto sanguíneo (figura 1.1, 8), ingere os gametócitos, os quais rompem a parede das hemácias e são liberados no estômago do vetor. Nesse local, os microgametas sofrem o processo de exflagelação, tornando-se uma célula móvel e com complexo apical, e movimentam-se ativamente em busca do macrogametócito (figura 1.1, 9). O encontro dos núcleos forma o zigoto ou oocineto (figura 1.1, 10), que se encista na parede do estômago do mosquito e, no seu interior, formam milhares de esporozoítos (figura 1.1, 11). Estes são liberados na hemocele e migram até as glândulas salivares, onde poderão ser injetados no hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo (figura 1.1, 12) [1,2].



### **Figura 1.1 - Ciclo biológico do *Plasmodium***

No hospedeiro: (1) mosquito anofelino realiza o repasto sanguíneo e injeta os esporozoítos; (2) célula hepática infectada; (3) esquizonte se forma dentro da célula hepática; (4) esquizonte se rompe liberando os merozoítos; (5) merozoítos penetram na hemácia, infectando-a; (6) trofozoíto se desenvolve e forma o esquizonte, o qual vai se romper e liberar novos merozoítos que vão infectar outras hemácias; (7) trofozoíto se desenvolve para gametócito, podendo se diferenciar em femininos e masculinos; (8) mosquito anofelino realiza repasto sanguíneo e ingere os gametócitos. No mosquito: (9) gametócito produz macrogameta e microgameta exoflagelado e o microgameta fecunda o macrogameta; (10) após fecundação forma-se o oocineto; (11) oocineto se encista, sendo chamado agora de oocisto, formando muitos esporozoítos no seu interior; (12) oocisto se rompe, liberando milhares de esporozoítos que irão migrar até as glândulas salivares do mosquito. [6]

A malária ainda é um grande problema de saúde pública, uma vez que aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas, cerca de metade da população mundial, estão sobre o risco de contrair a doença. Em 2015, 95 países e territórios apresentaram transmissão de malária, em locais na América Latina, Ásia, Oriente Médio e África subsaariana, sendo o último o lugar com maior número de casos (88%) e mortes (90%), onde nesse mesmo ano a malária foi a quarta maior causa de morte em crianças até cinco anos idade. É estimado que desde 2001 já ocorreram 6,2 milhões de mortes por malária [7].

No Brasil, a área amazônica é considerada endêmica, com 99% dos casos autóctones. Nas áreas fora da região amazônica, 80% dos casos registrados são provenientes de áreas endêmicas, de países africanos e outros países amazônicos, também podendo ocorrer transmissão de malária em áreas de Mata Atlântica [8]. O levantamento realizado no ano passado pelo Ministério da Saúde aponta que em 2015 o país registrou o menor número da doença em 35 anos. Em 2015, foram notificados cerca de 143 mil casos, com 26 mortes, com redução de 77% em relação ao ano 2000 [9]. Já em 2016, até setembro, foram registrados cerca de 77 mil casos, reduzindo ainda mais o número de indivíduos infectados [10].

Além da transmissão pela picada do anofelino, também pode-se contrair a malária por meio da contaminação de sangue infectado, através de transfusões de sangue e uso compartilhado de agulhas e/ou seringas contaminadas, e por transmissão congênita, pela mistura do sangue materno com o fetal, tanto no momento do parto como intra-uterina [2]. Uma vez que a transmissão pela picada do mosquito é de longe a mais frequente, muitas das medidas profiláticas são voltadas para o vetor, como o uso de mosquiteiros

impregnados com inseticidas, já que os anofelinos costumam picar preferencialmente durante o horário noturno e dentro das casas. Outras medidas empregadas são a prevenção de viajantes em áreas endêmicas, como a recomendação de uso de repelente e roupas adequadas para proteção de picadas de mosquitos, e o uso de quimioprofilaxia em determinadas circunstâncias. Graças à intensificação e fortalecimento dos programas de controle de malária, visando ao monitoramento dos casos, controle dos vetores, diagnóstico e tratamento no início da doença e educação em saúde [2], a taxa de incidência da doença nas populações de risco caiu 37% no período de 2000 a 2015, com a taxa de mortalidade caindo 60% em todas as faixas etárias e 65% em crianças menores de cinco anos de idade [7].

A malária pode se dar de forma assintomática ou ser leve em casos de baixa parasitemia, em pacientes que já foram muito expostos à doença e adquiriram resistência ou nos pacientes que já nasceram com algum tipo de resistência, impedindo naturalmente que o plasmódio se instale no organismo e se desenvolva. A infecção por *P. falciparum* e, menos frequentemente, por *P. vivax*, pode levar a formas graves da malária, com complicações como malária cerebral, anemia, hipoglicemia, desenvolvimento da síndrome de insuficiência respiratória, coagulopatia e trombocitopenia, alterações hidroeletrólíticas, disfunções renal, hepática, metabólica e esplênica e até mesmo levar à morte [2]. Os grupos mais afetados pelas patologias da forma complicada são as crianças menores de cinco anos, indivíduos adultos não imunes, grávidas e pacientes com HIV/AIDS [7].

Para o tratamento da malária é necessário avaliar qual a espécie presente no paciente naquele momento, determinar se o mesmo se encontra na forma grave ou não da doença, se faz parte do grupo de maior risco de evolução para a forma grave e o conhecimento das áreas epidemiológicas que já possuem resistência aos antimaláricos [2]. A questão da resistência é de suma importância e, por conta do aparecimento e disseminação de cepas resistentes, os esquemas de tratamentos e as drogas de escolha vêm sendo modificados [11]. O melhor tratamento disponível no momento é a terapia combinada de derivados da artemisinina, principalmente se a infecção for por *P. falciparum* [7]. No entanto, se o diagnóstico e o tratamento da malária forem

tardios, mesmo o melhor tratamento pode não ser eficaz, pois a doença já pode se encontrar na forma grave. Portanto, é ainda necessário criar novas opções terapêuticas para o tratamento da malária grave, buscando um maior sucesso no tratamento.

## 1.2 Malária cerebral

A malária cerebral (MC) é um dos quadros graves que a infecção por *P. falciparum* pode gerar, apesar de casos raros por *P. vivax* também já terem sido relatados [12]. Alguns ensaios clínicos revelaram que a MC é altamente letal, mais que outras complicações da malária falciparum. Estudos mostraram que o tratamento com artesunato intravenoso é superior a quinina intravenosa ou artemeter intramuscular pois diminui a mortalidade e os sintomas, por isso, o artesunato é o tratamento de escolha para MC. Apesar da eficácia do artesunato intravenoso e atendimento médico adequado, a taxa de mortalidade para MC ainda é alta. Enquanto a mortalidade geral por malária grave em pacientes hospitalizados e tratados com artesunato intravenoso era de cerca de 8%, a mortalidade em casos com comprometimento neurológico (coma) podia atingir 30% [13,14]. Estima-se que dos casos de MC, 10-20% são fatais, ou seja, cerca de 300 mil a 500 mil mortes por ano [15]. Esta síndrome ocorre principalmente na África subsaariana, atingindo em maior parte crianças menores de cinco anos e sendo rara em adultos. Porém, no sudeste asiático, onde a transmissão de malária não é suficientemente intensa para gerar uma imunidade consistente, observa-se que a MC atinge com maior frequência crianças mais velhas e adultos [16]. A MC acomete o sistema nervoso central, levando o indivíduo ao coma e, posteriormente, ao óbito. O coma que persiste por mais de 1 hora após uma convulsão, na presença de parasitemia por *P. falciparum*, é o que define a MC e, embora diversos estudos tenham classificado como MC situações de perda transitória da consciência, porém, essa classificação pouco rigorosa deve ser evitada [15]. Já foi observado que em adultos do sudeste asiático a disfunção do sistema nervoso central ocorre frequentemente em conjunto com falha de outros órgãos, particularmente os sistemas respiratório e renal, enquanto que nas crianças africanas pode ocorrer

uma síndrome puramente neurológica, levando rapidamente ao coma, convulsões e anemia, com ausência de disfunção renal ou respiratória [17,18].

Os sintomas iniciais da MC são difíceis de diferenciar de outras doenças, como meningite, encefalite ou convulsões febris, uma vez que diarreia, vômito e dor de cabeça são sintomas muito genéricos, atrasando o início do tratamento [19]. Por isso, é importante que sejam identificados logo os sintomas gerais da malária, já podendo desconfiar da evolução da doença para a forma grave. Exames específicos, como o da retina, podem auxiliar na definição de um diagnóstico preciso [15].

O estudo de Taylor et al. [20] comparou evidências, em autópsias de crianças, de sequestro de parasitas intracerebrais com os diagnósticos clínicos antes da morte, e verificou uma frequência elevada de erros de diagnóstico, demonstrando que em diversos casos a morte atribuída à malária foi causada, na realidade, por outros fatores. Concluiu ainda que a presença de retinopatia é altamente sugestiva para a presença de sequestro de parasitas intracerebrais, característica histopatológica típica da MC. A retinopatia pode ser observada por clínicos não-especialistas, pelo uso direto de um oftalmoscópio nas pupilas dilatadas, e ela apresenta duas características fortes indicativas de MC: descoloração branca ou amarela dos vasos da retina e branqueamento desigual da mácula [15]. A severidade da retinopatia tem sido usada como prognóstico para MC, tanto em crianças como adultos [21]. A redução na perfusão da microvasculatura da retina na maior parte dos casos de crianças com MC podem ser identificadas pelo angiograma, criando os chamados 'vasos fantasmas' (*ghost vessels*), evidenciando a isquemia e hipóxia, as quais são componentes importantes na patogênese da MC [22].

Os distúrbios mais graves causados por *P. falciparum* se devem, principalmente, aos fatores de virulência desse parasita. Durante seu desenvolvimento intracelular, *P. falciparum* transporta proteínas parasitárias para a membrana do eritrócito, modificando sua estrutura e função, o que favorece a sua sobrevivência e crescimento. As proteínas inseridas na membrana das hemácias parasitadas, principalmente a proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1), formam os *knobs*, estruturas que permitem a citoaderência às células endoteliais de órgãos nobres, como o

cérebro e os pulmões. Dessa forma, as hemácias parasitadas podem ser sequestradas na microvasculatura, juntamente com outras não parasitadas, formando as rosetas, que se acumulam nos vasos e dificultam a passagem do sangue naquela região [2,23]. O sequestro de tais hemácias é vantajoso para o parasita, uma vez que evita a destruição das mesmas e, conseqüentemente, do parasita, pelo baço. Diversas proteínas endoteliais são reconhecidas pela proteína PfEMP1, servindo como ligantes, como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão de leucócitos endotelial 1 (ELAM-1), P-selectina, ácido hialurônico, condroitina sulfato A (CSA), CD36. Estudos mostram que a ICAM-1 parece ter um importante papel no desenvolvimento da MC, já que sua expressão é aumentada nas células endoteliais dos microvasos cerebrais de pacientes com MC, além da mortalidade associada a MC em animais ICAM-1<sup>+/+</sup> ser significativamente maior do que em animais ICAM-1<sup>-/-</sup> [24, 25].

Além do sequestro de eritrócitos parasitados, pode ocorrer também sequestro de leucócitos e plaquetas nos capilares e nas vênulas pós-capilares do cérebro, devido à ativação endotelial. Essa ativação é caracterizada pela expressão das variadas moléculas de adesão nas células endoteliais, como já mencionado, pela quebra das junções oclusivas, exocitose dos corpos de Weibel-Palade (WPBs), liberação de micropartículas endoteliais, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e moléculas solúveis de adesão celular (sCAMs). A angiopoietina-2 (Ang-2), uma das moléculas liberadas pelos WPBs, aumenta a permeabilidade vascular e facilita a ativação endotelial, portanto, o excesso dos níveis de Ang-2 circulante pode levar ao derrame vascular no cérebro durante a MC. A angiopoietina-1 (Ang-1) promove quiescência das células endoteliais e sobrevivência e as taxas de Ang-2/Ang1 têm sido reconhecidas como um informativo clínico de biomarcadores no prognóstico da MC [26]. Crianças do Malawi com MC apresentavam taxas muito altas de micropartículas endoteliais circulantes com alto potencial patogênico [27] e a introdução dessas micropartículas em camundongos saudáveis induziu sinais como os da MC no cérebro e nos pulmões dos animais, indicando um papel patogênico das mesmas na MC [28].

O acúmulo de plaquetas nos microvasos cerebrais também gera danos ao indivíduo. Os  $\alpha$ -grânulos liberados pelas plaquetas liberam fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), ocorrendo um aumento local desta citocina, podendo induzir apoptose no endotélio. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), liberado por macrófagos, pode aumentar a expressão de receptores de moléculas de adesão na membrana celular, auxiliando a citoaderência de esquizontes sanguíneos de *P. falciparum* nas células endoteliais dos microvasos cerebrais. Essa adesão e os agregados parasitários causam maior produção de TNF- $\alpha$  [12]. Já foi observado que as plaquetas possuem um efeito pró-apoptótico dependente de contato nas células endoteliais quando estimuladas por TNF- $\alpha$ , portanto, o acúmulo de TNF- $\alpha$  na região gera maior dano celular e agrava as lesões cerebrais [29].

A quebra da barreira hematoencefálica possui grande importância na patogenia da MC. A barreira hematoencefálica mantém a homeostase, já que protege o cérebro contra patógenos potencialmente danosos ao organismo e de macromoléculas que podem estar presentes no sangue, além de manter o fornecimento constante de oxigênio e nutrientes necessários no tecido cerebral e filtrar resíduos como creatinina, ureia, dióxido de carbono e os demais resíduos de volta para o sangue [30]. A quebra dessa barreira na MC tem sido evidenciada pelo sequestro das hemácias parasitadas na microvasculatura cerebral [32], pela ativação endotelial e rompimento da integridade das células que formam a barreira. As evidências se devem ao fato de se ter observado em pacientes com MC regulação positiva da expressão de ICAM-1, presença das proteínas de junção celular, ocludina e vincilina, nos vasos contendo eritrócitos sequestrados e indução generalizada de sialoadesão e receptor *scavenger* em macrófagos perivasculares nos vasos com e sem hemácias parasitadas. Esses antígenos geralmente são induzidos por fatores no plasma e estão ausentes no sistema nervoso central, sugerindo que as proteínas plasmáticas devem ter atravessado o endotélio cerebral [31,33].

Sequelas neurológicas são comuns de se observar em crianças que tiveram MC, que podem adquirir cegueira cortical persistente, surdez, ataxia, paresia, hemiplegia, epilepsia, paralisia cerebral severa, dano cognitivo e déficit de linguagem [31,34] A maior parte dos distúrbios neurológicos mencionados

acima costumam desaparecer dentro de seis meses, entretanto o dano cognitivo pode ser persistente [35], sendo que problemas de déficit de atenção podem se desenvolver após seis meses do quadro de MC [36]. É importante ressaltar que, dos indivíduos sobreviventes à MC, 10 a 20% desenvolvem algum tipo de disfunção cognitiva ou física de longo prazo [35,37,38], evidenciando que mesmo com os tratamentos atuais disponíveis a sobrevida é baixa e ainda há o risco de sequelas neurológicas futuras.

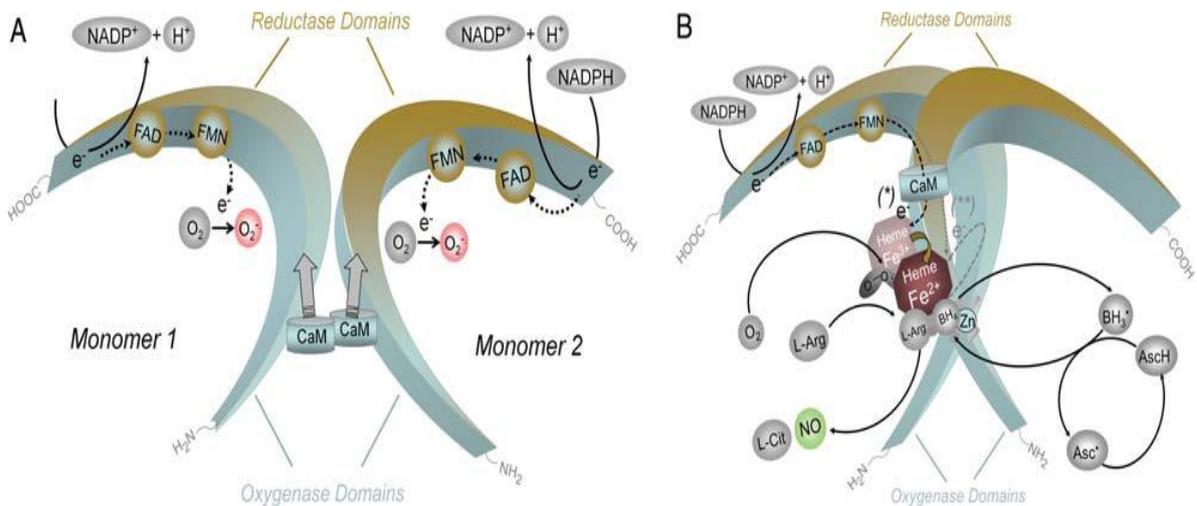
### **1.2.1 Papel do óxido nítrico na vasoconstrição na malária cerebral**

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula gasosa e lipofílica, relativamente estável, mas rapidamente destruída pelo oxigênio, que se difunde pelas células e age como um mediador ubíquo em uma variedade de processos biológicos [39]. Ele é a molécula de menor peso molecular secretada pelas células dos mamíferos e possui meia-vida em torno de 3 a 60 segundos. O NO, dependendo da situação, pode ser oxidante ou redutor, citotóxico e vasodilatador e pode modular tanto reações inflamatórias como anti-inflamatórias. Essa molécula possui alta afinidade com o grupamento heme, presente em diversas proteínas intracelulares, como ciclooxigenase, guanilato ciclase solúvel (sGC), hemoglobina e óxido nítrico sintase (NOS) [40].

Durante um ciclo catalítico completo, a enzima NOS, presente no citosol, converte uma molécula do aminoácido L-arginina e duas de O<sub>2</sub> em uma molécula de NO, uma de L-citrulina e duas de água (H<sub>2</sub>O) [41]. A L-arginina pode ser alternativamente metabolizada pela arginase em ureia e L-ornitina, reduzindo a produção de NO e contribuindo para alguns distúrbios vasculares [42].

A NOS possui três isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS), ambas constitutivas, e NOS induzida (iNOS), sendo esta induzível por resposta do sistema imunológico. Os monômeros individuais de NOS não desencadeiam qualquer atividade enzimática mas, quando ligadas à unidade {Zn(Cys)}<sub>4</sub>, passam para a forma homodimérica ativa [41]. Todas as três isoformas requerem os cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD),

flavina mononucleotídeo (FMN) e o grupamento heme. A ligação do cofator  $BH_4$  é importante para estabilizar a forma dimérica ativa da enzima eNOS [43]. As formas eNOS e nNOS requerem a ligação de calmodulina para a atividade enzimática, sendo que sua afinidade pela enzima pode depender ou não das concentrações de cálcio. Já a iNOS, embora também dependente da calmodulina, não depende dos níveis de cálcio [41] (figura 1.3).



**Figura 1.2 - Mecanismos catalíticos e estrutura da NOS funcional**

(A) Os elétrons de NADPH são transferidos pelos monômeros de NOS para FAD e FMN e possuem capacidade de reduzir  $O_2$  em  $O_2^-$ . Os monômeros podem ligar calmodulina (CaM) ao seu domínio redutase, aumentando a transferência de elétrons dentro desse domínio. Os monômeros de NOS não conseguem se ligar ao cofator  $BH_4$  e ao substrato L-arginina (L-arg), sendo incapaz de catalisar a produção de NO. (B) Na presença do grupamento heme a NOS forma um dímero funcional, sendo o heme essencial para conseguir transferir elétrons das flavinas para o heme do monômero oposto. O fluxo de elétrons ocorre apenas de um domínio redutase de um monômero para o domínio oxigenase do outro monômero. Quando há  $BH_4$  e quantidade suficiente de L-arg, os dímeros de NOS acoplam seus heme e reduzem  $O_2$ , sintetizando NO e L-citrulina (L-cit). Todas as isoformas de NOS possuem um íon de zinco (Zn), essencial para a ligação de  $BH_4$  e L-arg. A transferência de elétron do domínio redutase (\*) habilita o heme férrico da NOS ( $Fe^{3+}$ ) a ligar  $O_2$  e formar  $Fe^{2+}$ . O  $Fe^{2+}$  pode receber um segundo elétron (\*\*) de  $BH_4$  ou do domínio redutase. O  $BH_4$  oxidado resulta em  $BH_3^+$ , que pode ser reciclado para  $BH_4$  pela própria NOS, usando um elétron provindo das flavinas. O ácido ascórbico (AscH) também pode reduzir o radical  $BH_3^+$  para  $BH_4$ . [44]

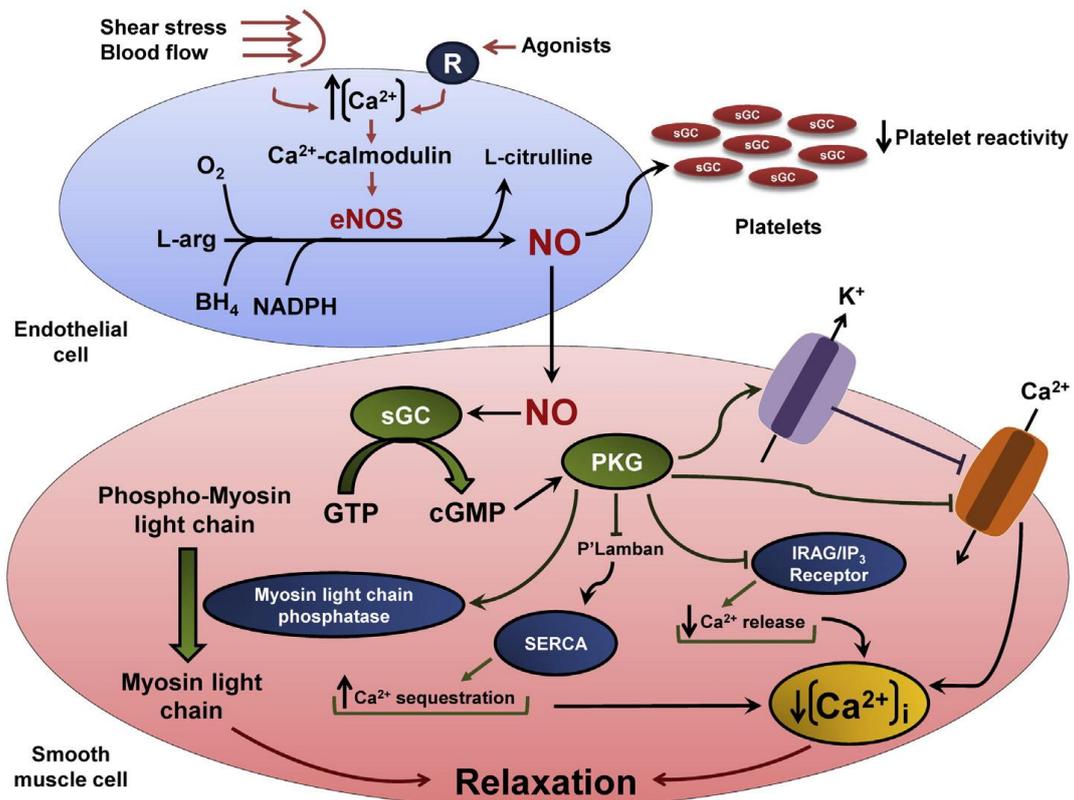
A isoforma iNOS possui capacidade imunoprotetora, combatendo vírus e bactérias durante alguma infecção, não sendo expressa em células somáticas saudáveis, porém pode ser rapidamente transcrita em resposta a alguma infecção. Ela pode produzir altas concentrações de NO em um curto período de tempo, o que não ocorre com a eNOS e nNOS. Quando induzida por citocinas e lipopolissacarídeos (LPS, TNF- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ])

nos macrófagos produz NO, que no fagolisossomo se combina com espécies reativas de oxigênio formando peroxinitrito, com efeito citostático, por inibição de enzimas contendo ferro, podendo causar fragmentação do DNA. Ela também pode atuar em células tumorais [40,41,45].

A isoforma nNOS, apesar de ter 'neuronal' em seu nome, pode ser encontrada no cérebro, nas terminações nervosas e nos músculos. Ela pode modular diversos processos cardiovasculares, atuando no relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação, na regulação central da pressão sanguínea, na transmissão sináptica do sistema nervoso central e ainda está envolvida na formação de memória. Sob condições normais, a nNOS também participa de muitos processos no cérebro, como na neurogênese, e seu mau funcionamento pode ajudar a desenvolver doença de Parkinson e danos por isquemia cerebral [40,41,45]. O NO gerado pela nNOS é parte importante da regulação fisiológica do fluxo sanguíneo cerebral pela chamada unidade neurovascular, composta por endotélio, pericitos, neurônios e terminações de astrócitos, tendo um papel integrador entre as demandas metabólicas e o fluxo sanguíneo cerebral [46].

Já a isoforma eNOS é de extrema importância para a homeostase do sistema cardiovascular. Ela é essencial para o processo de vasodilatação e, para isso, é necessária a integridade do endotélio vascular. O endotélio regula o tônus vascular, estrutura e função por meio do controle da liberação de diversos mediadores, inclusive NO derivado da eNOS. A inibição ou ausência dessa isoforma leva à diminuição da produção de NO, causando vasoconstrição, hipertensão e aneurismas severos em alguns casos. A regulação do VEGF é também realizada pela eNOS, inibindo a proliferação de células da musculatura lisa vascular, por meio da inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  dependente de guanosina monofosfato cíclica (cGMP). Outro mecanismo antiproliferativo do NO inclui a inibição da atividade da arginase e ornitina descarboxilase, reduzindo a formação de poliamidas necessárias para a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA). O NO produzido no endotélio, além de induzir o relaxamento do tônus vascular e possuir importante papel na proliferação celular, também reduz a adesão leucocitária e agregação plaquetária, pois inibe interações de células sanguíneas circulatórias com a parede do vaso [40,41,45,47].

No processo de vasodilatação, o NO produzido nas células endoteliais difunde pela membrana das células musculares lisas, presentes nos vasos, ou para as plaquetas, e se liga ao grupamento heme da sGC, ativando-a. Quando a sGC se encontra ativada, catalisa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em cGMP. Esse processo inibe a reatividade plaquetária, enquanto aumenta as concentrações de cGMP nas células musculares lisas dos vasos, o que ativa a proteína quinase G-1 (PKG-1). A PKG-1 fosforila os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ , resultando na abertura desses canais e permitindo a perda do  $K^+$  intracelular, hiperpolarizando a membrana plasmática e reduzindo o influxo de  $Ca^{2+}$  por meio dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo L (dependentes de voltagem). Além disso, a PKG-1 também pode fosforilar os canais de  $Ca^{2+}$  tipo L, inibindo a função do canal, fosforilar o receptor de inositoltrifosfato ( $IP_3$ ) associado ao substrato de cGMP quinase (IRAG) e fosforilar a proteína fosfolambam, localizada no retículo sarcoplasmático. A fosforilação da IRAG leva à inibição da atividade do receptor de  $IP_3$ , suprimindo a liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, enquanto a fosforilação da fosfolambam ativa seu efeito inibitório na ATPase do retículo sarcoplasmático, promovendo o sequestro de  $Ca^{2+}$  nessa região. Essas múltiplas fosforilações resultam na queda dos níveis intracelulares de cálcio livre, causando uma diminuição na formação de complexos  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que se ligariam às quinases da cadeia leve da miosina, presente na musculatura, levando ao relaxamento do músculo liso, dilatando o vaso. Além disso, a PKG-1 pode ativar a fosfatase da cadeia leve da miosina para diminuir a fosforilação desta cadeia, também contribuindo para a vasodilatação [39,47-49] (figura 1.3).



**Figura 1.3 - Mecanismos para a formação de NO e vasodilatação**

Na célula endotelial, com os estímulos do fluxo sanguíneo, tensão de cisalhamento na membrana celular e ligação de agonistas no receptor de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentam os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à formação de complexos  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Esses complexos ativam a enzima eNOS e, quando ativada, ela gera uma molécula de NO e uma de L-citrulina a partir da L-arginina e  $\text{O}_2$ , mas apenas com a participação de  $\text{BH}_4$  e NADPH ( $\text{BH}_4$  faz a eNOS ficar na sua forma ativa dimérica e NADPH doa elétrons). O NO gerado pode se difundir para as plaquetas, inibindo a função plaquetária, ou difundir para as células musculares lisas presentes nos vasos. Nas células musculares lisas, o NO liga-se e ativa a sGC, a qual catalisa a conversão de GTP em cGMP. A cGMP ativa a PKG-1, levando a múltiplas fosforilações de proteínas celulares, como IRAG/ $\text{IP}_3$  (inibe a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfolamban ( $\text{P}^i$ Lamban; aumenta o sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo sarcoplasmático) e fosfatase da cadeia leve de miosina. A PKG-1 também fosforila os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L e os canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . A redução do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e a fosforilação da cadeia leve da miosina levam ao relaxamento vascular [47].

O NO endógeno pode exercer efeitos antioxidantes nas células vasculares quando aumenta a expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase, a qual catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) para peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [50]. Esse efeito pode acontecer por meio da regulação positiva da expressão de ferritina e heme oxigenase-1 (HO-1), que diminui as concentrações de  $\text{O}_2^-$  nos vasos sanguíneos. Entretanto,  $\text{H}_2\text{O}_2$  também pode atenuar o estresse oxidativo por meio da ativação da eNOS pela oxidação de proteínas quinases redox sensíveis, que promovem a fosforilação

da eNOS. Esse efeito aumenta a habilidade vascular de diminuir o estresse oxidativo [51]. Por outro lado, a interação do NO com o  $O_2^-$  resulta na formação de peroxinitrito ( $NO_3^-$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) e esses compostos reagem com proteínas, lipídios ou DNA, causando estresse oxidativo, potencializando a lesão inflamatória nas células vasculares. Quando os níveis de NO aumentam como, por exemplo, resultado da regulação positiva de iNOS, a formação de peroxinitrito prevalece e prejudica a homeostase vascular, resultando em disfunção endotelial, um fator importante na hipertensão. As espécies reativas de oxigênio podem ainda oxidar cofatores na eNOS, como  $BH_4$ , levando à mudança da forma dimérica para monomérica da enzima e, na conformação monomérica, a eNOS está desacoplada, sintetizando  $O_2^-$  ao invés de NO, o que também irá resultar em danos ao sistema cardiovascular [41,47,49].

A expressão de HO-1, uma enzima que cataboliza o grupamento heme em ferro, biliverdina e monóxido de carbono (CO), é regulada pelo heme livre, liberado em grandes quantidades em processos hemolíticos como na malária. É postulado que o heme possui um papel importante na patogênese da malária cerebral, pois na presença de  $H_2O_2$ , o heme pode causar a ruptura da barreira hematoencefálica [52]. Em diversos modelos, como de hipertensão, inflamação pulmonar, isquemia cardíaca e de malária cerebral, a HO-1 mostrou efeito citoprotetor, com propriedades anti-inflamatórias. A indução farmacológica de HO-1 e a exposição de CO previnem a ruptura da barreira hematoencefálica, o congestionamento da microvasculatura cerebral e a neuroinflamação encontrada na malária, por meio da ligação do CO à hemoglobina, prevenindo a oxidação da mesma e a geração de heme livre. Além disso, o CO pode limitar os efeitos deletérios da inflamação por meio da inibição da via do fator nuclear  $\kappa B$ , inibindo a geração de citocinas pró-inflamatórias, e prevenindo a ativação, agregação plaquetária e apoptose em diversos tipos celulares [52,53]. Um dos possíveis mecanismos, ainda não investigado, pelo qual a indução de HO-1 seria benéfica na malária cerebral é que o CO também tem a capacidade de se ligar à sGC e ativá-la, aumentando os níveis de cGMP, e esses níveis são significativamente menores do que quando a sGC é ativada pelo NO [54]. Deste modo, o CO assim produzido teria efeito semelhante ao do NO em reverter o processo vasoconstritivo, restaurando o fluxo sanguíneo.

Tem sido postulado que o NO possui tanto efeito citoprotetor como citotóxico na malária. A hipótese do efeito protetor se deve ao fato de que alguns estudos mostraram que durante a MC os altos níveis de citocinas inflamatórias estimulam a atividade da iNOS em macrófagos, aumentando a produção de NO e, conseqüentemente, peroxinitrito, que vai agir sobre os parasitas, destruindo-os [55]. Nos tecidos, o NO metabolizado a peroxinitrito em condições de estresse oxidativo pode causar mudanças estruturais no DNA, podendo degenerar neurônios e talvez ser o responsável pelo coma irreversível em pacientes com MC [56]. Existe ainda a possibilidade de efeito citotóxico atribuído ao NO pelo fato de tal molécula poder se difundir pela barreira hematoencefálica e penetrar o tecido cerebral, destruindo neurônios através da inibição da citocromo c oxidase, que é o complexo IV da cadeia transportadora de elétrons na respiração celular, ligando-se reversivelmente à sua porção heme [57]. Entretanto, como descrito a seguir, vários estudos têm consolidado a noção de que na malária grave o problema não é o excesso de NO e sim sua baixa biodisponibilidade.

No estudo de Anstey et al. [58] foi observado em crianças da Tanzânia com malária grave que os níveis plasmáticos e urinários de nitrito e nitrato (marcadores indiretos da disponibilidade de NO) estavam inversamente relacionados à gravidade da doença. Os níveis plasmáticos de IL-10, uma citocina que inibe a síntese de NO, aumentavam com a gravidade da doença. Além disso, a expressão da iNOS era observada em todas as crianças controles mas era indetectável nas crianças com MC, mostrando que a supressão da síntese de NO contribuía para a patogenia da malária e reforçando seu papel protetor. Dessa forma, foi notado que durante a MC pode ocorrer baixa biodisponibilidade de NO devido ao seu sequestro pela hemoglobina livre, liberada com o rompimento das hemácias, e a arginase, também liberada na hemólise, que compete pelo mesmo substrato da enzima geradora de NO, o aminoácido L-arginina [58,59]. Ao diminuir os níveis desse aminoácido, não há precursor para formar o NO, diminuindo os seus níveis séricos no organismo doente [60]. A dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno de NOS, se encontra em níveis elevados no plasma de pacientes adultos com malária grave e está associado à baixa

biodisponibilidade de NO vascular e pulmonar, sugerindo que a inibição de NOS pela ADMA deve contribuir para o aumento de mortalidade nessa doença [61]. Já as crianças sob o mesmo quadro apresentam níveis reduzidos de ADMA, apesar da hipoargininemia ser mais intensa do que nos adultos [62].

Como o NO possui um importante papel na manutenção do tônus vascular, regulando o fluxo sanguíneo e modulando as moléculas de adesão celular endotelial, quando há redução dos níveis plasmáticos de NO na MC ocorre disfunção endotelial nos microvasos cerebrais, causando vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo cerebral. Isso leva à diminuição dos níveis de oxigênio no tecido cerebral, ocorrendo hipóxia, isquemia e levando o indivíduo ao coma [63,64]. Com a suplementação de L-arginina intravenosa em pacientes com malária falciparum moderada e grave, a taxa de função endotelial foi aumentada, assim como a taxa de NO exalado e diminuição dos níveis de lactato, o qual está associado à disfunção endotelial. Isso mostrou que a disfunção endotelial na malária poderia ser revertida com L-arginina, pois recuperaria a hipoargininemia e da acidose láctica [63,65]. No entanto, outro estudo de Yeo e colaboradores [66] mostrou que apesar da infusão de L-arginina por 8 horas ser segura, não promoveu o clareamento de lactato e também não aumentou a biodisponibilidade de NO.

### **1.3 Modelo de malária cerebral experimental**

Muitos estudos têm sido conduzidos para a compreensão dos processos fisiopatológicos da MC, e na tentativa de desenvolver terapias mais eficazes. Apesar dos esforços, o estudo da MC ainda é muito complicado devido às limitações das abordagens exploratórias possíveis em pacientes, e por isso grande parte das informações disponíveis foram obtidas com o estudo de cérebros *post-mortem*. Como a maior parte das pesquisas de MC humana são de amostras de casos fatais, torna-se difícil descrever a sequência de eventos que resultou no desenvolvimento da MC e até mesmo analisar fatores intervenientes no desfecho, seja tal a morte ou o sucesso do tratamento [19].

A partir dos anos 1970, os cientistas começaram a tentar simular em hamsters, ratos e camundongos a MC humana por meio da infecção por *P.*

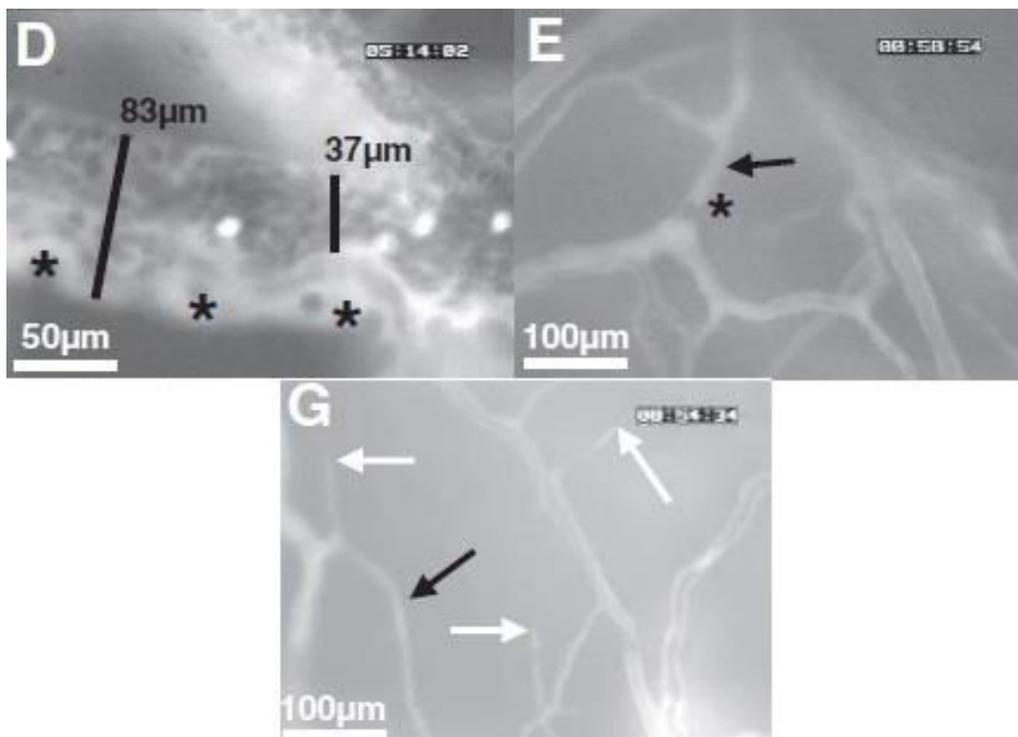
*berghei* ou *P. yoelli*, mas os modelos falharam em definir qual linhagem seria mais adequada, tanto dos animais como do plasmódio. Em 1982, Rest [67] conseguiu mostrar que a infecção por *P. berghei* ANKA (PbA) em algumas linhagens de camundongos reproduzia as características da MC humana, com hemorragias cerebrais, alta parasitemia e sequestro de monócitos, eritrócitos parasitados e não parasitados nos vasos cerebrais. Modelos de MC em primatas foram também descritos, porém, estes possuem alto custo e são restritos por questões éticas [19].

O modelo murino, ou modelo de malária cerebral experimental (MCE), apresenta os sinais clínicos de uma síndrome neurológica com convulsões, ataxia, paralisia das patas e coma [68]. Ele possui algumas diferenças patológicas como, por exemplo, há maior sequestro de leucócitos nos vasos cerebrais ao invés de hemácias parasitadas. Por esse motivo, a relevância do modelo tem sido debatida [69-72].

Como em todo modelo experimental, onde a representação de uma doença em um animal nunca se dará da mesma forma que na humana, esse modelo possui diversas características semelhantes à MC humana. Em ambas, ocorre rápida deterioração nas condições dos indivíduos infectados quando os sinais clínicos da MC se tornam aparentes, podendo ir a morte em poucas horas após o desencadeamento da síndrome neurológica. Em ambos os casos, os indivíduos afetados apresentam microhemorragias difusas, vazamento vascular, edema, disfunção endotelial, aumento de adesão de células como ICAM-1, quebra da barreira hematoencefálica, vasoconstrição, obstrução mecânica dos vasos por acúmulo de células e baixa biodisponibilidade de NO [23,73,74]. O acesso direto à hemodinâmica da pia mater por microscopia intravital em camundongos com a doença mostrou que a MCE está associada à hipóxia progressiva no tecido cerebral e acidose [75]. Os distúrbios na hemodinâmica da microcirculação cerebral têm se mostrado semelhantes aos observados na retina *in vivo* de pacientes com MC, com estreitamento do lúmen vascular pela aderência de leucócitos, o que é similar aos supostos defeitos causados pelo acúmulo de hemácias parasitadas nos vasos retinianos, redução do fluxo sanguíneo e vasos ocluídos com áreas de fraca ou nenhuma

perfusão, sendo equivalente aos *ghosts vessels* de clareamento retiniano [21,22,74] (figura 1.2).

Os animais infectados com PbA também apresentam déficit cognitivo, assim como em humanos. Isso pode ser observado por meio da análise do desempenho dos animais em testes comportamentais, como na tarefa de campo aberto, reconhecimento de objetos, esQUIVA inibitória, labirinto aquático de Maze, entre outros. A memória visual se mostra prejudicada em tais testes, demonstrando dificuldade no aprendizado e aquisição de memória, o que parece estar diretamente ligado a inflamação, hemorragia e ativação microglial [76]. A memória de longo prazo parece ser afetada a partir do 5º dia de infecção, com morte celular e aumento de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) no hipocampo e córtex frontal. Esta neuroinflamação influencia na expressão de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro e o fator de crescimento neuronal, importantes para a função, sobrevivência e desenvolvimento dos neurônios, comprometendo a neurogênese hipocampal [77]. Os achados sobre a cognição na MCE podem variar, pois em alguns estudos os tratamentos são realizados antes do estabelecimento da MCE, como um pré-tratamento e, em outros, após aparecimento dos sinais clínicos característicos da doença [78-80].



#### **Figura 1.4 - Microvasos cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados com PbA GFP**

Na imagem D, é mostrada a diminuição do diâmetro de uma vênula pela aderência de leucócitos ao endotélio (asteriscos); os pontos brilhosos são as hemácias parasitadas com PbA GFP (proteína verde fluorescente). Na imagem E, vasos previamente perfundidos com albumina-FITC (usado para melhor visualização dos vasos nas imagens); o vaso apontado pela seta preta não foi perfundido por causa do bloqueio de leucócito (asterisco), o qual obstruiu totalmente o fluxo naquela região. Na imagem G, pequenos vasos não perfundidos, com ausência de fluxo e conseqüente desaparecimento (setas brancas), associadas com outros vasos sem fluxo (seta preta). Adaptado de Cabrales et al. [74]

Todas essas similaridades fazem com que o modelo seja adequado para a compreensão dos diferentes aspectos envolvidos na fisiopatologia da MC, do papel de alguma célula, molécula ou via de desenvolvimento da doença, podendo ser usado para descobrir novos alvos terapêuticos e para testes de diferentes terapias contra a MC. Além de pesquisas de novas terapias para diminuir a mortalidade dos indivíduos afetados, estas também podem ser voltadas para a diminuição do dano cognitivo causado pela MC [78-80].

As similaridades entre a MC humana e a MCE são particularmente fortes e relevantes no que se refere à vasculopatia [70,81], em especial à disfunção endotelial e à baixa biodisponibilidade de NO e suas conseqüências. Estudos apontam que a causa principal do coma e morte pela MC é a obstrução do fluxo sanguíneo cerebral, resultante da vasculopatia grave [74,82].

Nosso grupo tem usado a MCE principalmente para estudar o processo de vasoconstrição associada à baixa biodisponibilidade de NO, tentando reverter a diminuição do fluxo sanguíneo por meio de terapias adjuvantes.

#### **1.3.1 Contribuições de nosso grupo para o entendimento da disfunção vascular na MCE**

Nosso grupo vem realizando diversos estudos utilizando metodologias como microscopia intravital de janela fechada em camundongos para estudar diretamente *in vivo* o papel da microcirculação cerebral tanto na patogenia quanto na terapêutica da MCE. Em 2010, foi publicado um vídeo-artigo descrevendo tal procedimento, que permite examinar diferentes aspectos na superfície cerebral, como: potencial hidrogeniônico (pH) e pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) nos vasos e tecido, aderência de leucócitos, hemácias e plaquetas, apoptose e necrose de neurônios e células endoteliais, perfusão,

velocidade das hemácias, fluxo sanguíneo, diâmetro vascular etc. [83]. No estudo de Cabrales et al. [74], foi mostrado por meio desse mesmo sistema que a MCE está associada a alterações marcantes na microcirculação cerebral, com bloqueio do fluxo e aparecimento de vasos fantasmas, colapso vascular, vasoconstrição e consequente queda do fluxo sanguíneo cerebral, sendo que em alguns casos tais fenômenos eram agravados pela ocorrência de hemorragias. Dois estudos foram realizados para traçar um paralelo entre tais alterações e o fenômeno de vasospasmo, observado em pacientes com hemorragia subaracnóidea. Com modelo de MCE, foi feito tratamento com nimodipina, um bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$  tipo L usado para prevenir vasospasmo cerebral em humanos. Em ambos, a administração de nimodipina em conjunto com um antimalárico, artemeter ou artesunato, aumentou significativamente a sobrevivência, induziu vasodilatação e aumentou o fluxo sanguíneo da pia mater. Esse dado indicou que a administração de drogas adjuvantes que causam relaxamento dos vasos pode ser o caminho para o tratamento da MCE [74,84].

Gramaglia e colaboradores [85] demonstraram que os camundongos com deficiência nas enzimas eNOS e iNOS possuíam mortalidade e parasitemia similar aos animais controles, entretanto, quando tratados com um doador de NO (dipropilenotriamina NONOate [DPTA-NO]), ficaram clinicamente indistinguíveis dos animais não infectados, enquanto os animais controles infectados já se encontravam em um estágio moribundo. A administração de NO exógeno restaurou as sinalizações no cérebro mediadas pelo NO, reduziu claramente o vazamento vascular e a hemorragia petequial no cérebro e diminuiu os biomarcadores pró inflamatórios no sangue. Ou seja, o NO exógeno não diminuiu a parasitemia, mas forneceu significativa proteção contra a MCE. O trabalho de Cabrales et al. [86] mostrou por meio de microscopia intravital que a suplementação de NO com DPTA-NO também preveniu a vasoconstrição e aumentou o fluxo sanguíneo em camundongos infectados com PbA, com arteríolas e vênulas de menor diâmetro respondendo melhor ao tratamento do que vasos de maior diâmetro. Além disso, o NO exógeno forneceu proteção contra hemorragias cerebrais e inflamação. Esse tipo de estudo mostra que a proteção de NO na MC está associada com a diminuição

do dano vascular e a melhora da hemodinâmica na microcirculação cerebral. Apesar das melhoras observadas com o DPTA-NO, ele não impediu completamente o processo inflamatório e as complicações microcirculatórias [86,87]. A administração de um doador e reservatório fisiológico de NO, glutathiona S-nitrosilada (GSNO), também mostrou proteção contra o desenvolvimento da MCE [88].

Em outro estudo com MCE, foi realizado tratamento com gliceril trinitrato transdermal juntamente com artemeter. O gliceril trinitrato é usado no tratamento de angina e falha cardiovascular por sua atividade dilatadora em artérias e veias largas. Ele induz o processo de biotransformação por denitrificação, formando NO, o qual vai ativar a sGC que irá relaxar a musculatura lisa do vaso, além de também diminuir o processo inflamatório. Esse tratamento aumentou a sobrevivência de 47% para 79%, sustentou a reversão da vasoconstrição arteriolar na MCE, e não diminuiu significativamente a pressão arterial nos camundongos infectados com hipotensão, demonstrando que essa terapia adjuvante baseada na reposição de NO pode ser uma candidata para o tratamento de MC [89].

Ong et al. [90] demonstraram que as enzimas eNOS e nNOS estão desacopladas na MCE, provavelmente por causa do estresse oxidativo, explicando um potencial mecanismo responsável para a disfunção da NOS nessa doença. A superfusão da pia mater com acetilcolina ou N-metil-D-aspartato (NMDA), que induzem vasodilatação dependente de eNOS e de nNOS, respectivamente, mostrou insensibilidade da resposta arteriolar cerebral a esses compostos nos animais infectados com MCE, não aumentando os níveis de NO. A resposta foi parcialmente recuperada pela suplementação exógena de BH<sub>4</sub>. As arteríolas cerebrais dos animais infectados por *P. berghei* NK65, um modelo que não desenvolve MCE, responderam à superfusão com acetilcolina ou NMDA, e as respostas não foram significativamente afetadas pela adição de BH<sub>4</sub>, indicando que a disfunção de eNOS e nNOS no cérebro ocorre especificamente na MCE. Também foi observado que ocorre diminuição da atividade total da NOS, aumento dos níveis de peroxidação lipídica e aumento de monômeros de eNOS e nNOS no cérebro, realçando que estas enzimas encontram-se desacopladas e, conseqüentemente, disfuncionais

durante a MCE. Ao realizar perfusão com GSNO obteve-se resposta das arteríolas cerebrais, mas com pouca intensidade, indicando que não há só deficiência na produção de NO mas, igualmente, a sinalização encontra-se prejudicada.

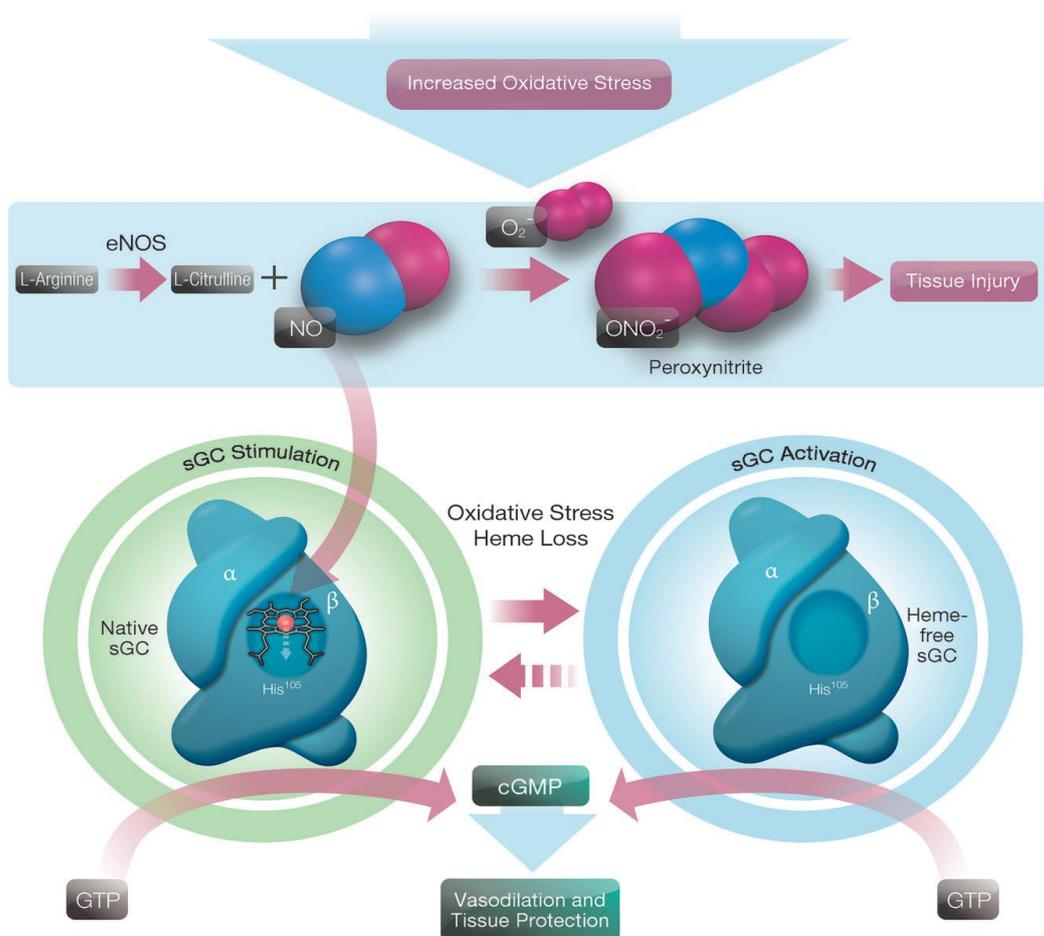
#### **1.4 Atuação dos ativadores e estimuladores da sGC na vasodilatação**

Como mencionado anteriormente, a molécula de NO produzida nas células endoteliais difunde-se para as células musculares lisas vasculares e se liga à sGC, ativando-a. Esta, por sua vez, irá transformar o GTP em cGMP, ocorrendo múltiplas fosforilações que irão levar ao relaxamento da célula, dilatando o vaso sanguíneo e aumentando o fluxo sanguíneo local. A via NO-sGC-cGMP, além de levar à vasodilatação, também inibe o recrutamento leucocitário, agregação plaquetária e proliferação das células musculares lisas. Portanto, a sGC é uma importante reguladora do sistema cardiovascular, estando presente nas plaquetas e nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos [44,47].

A sGC é uma proteína citosólica e heterodimérica, que consiste em uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ , com um grupo prostético heme localizado na subunidade  $\beta$ . Resumidamente, o NO estimula a atividade da sGC por meio da sua ligação ao  $\text{Fe}^{2+}$  do grupamento heme, o qual induz a clivagem da ligação  $\text{Fe}^{2+}$ -histidina, levando a reorganizações conformacionais que são propagadas na subunidade catalítica, onde a produção de cGMP a partir de GTP aumenta. A sGC pode existir em duas formas diferentes: a forma nativa ou também chamada de reduzida, que contém o grupamento heme (o receptor endógeno para o NO), e a forma sem o grupamento heme, encontrada quando ocorre estresse oxidativo. Em diversas doenças cardiovasculares pode ocorrer estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio, as quais são capazes de oxidar o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ ) presente no heme, resultando na perda do grupamento heme e tornando a sGC disfuncional. A forma livre do grupamento heme é rapidamente degradada por ubiquitinação [91].

Há quase duas décadas foi descoberta uma classe de compostos que são capazes de ativar as duas formas da sGC, independentemente da

presença do NO: os estimuladores e ativadores da sGC. Os estimuladores possuem duas formas de ação, podendo agir de forma sinérgica com o NO endógeno, sensibilizando a sGC para baixos níveis de NO, ou estimulando diretamente a forma nativa da enzima mesmo na ausência do NO. Já os ativadores atuam apenas na forma inativa da sGC, livre do grupamento heme, ou seja, a enzima poderá funcionar mesmo quando o NO não possuir mais efeito. Estimulando ou ativando a sGC, ela poderá aumentar os níveis de cGMP levando ao processo de vasodilatação [91,92] (figura 1.5).

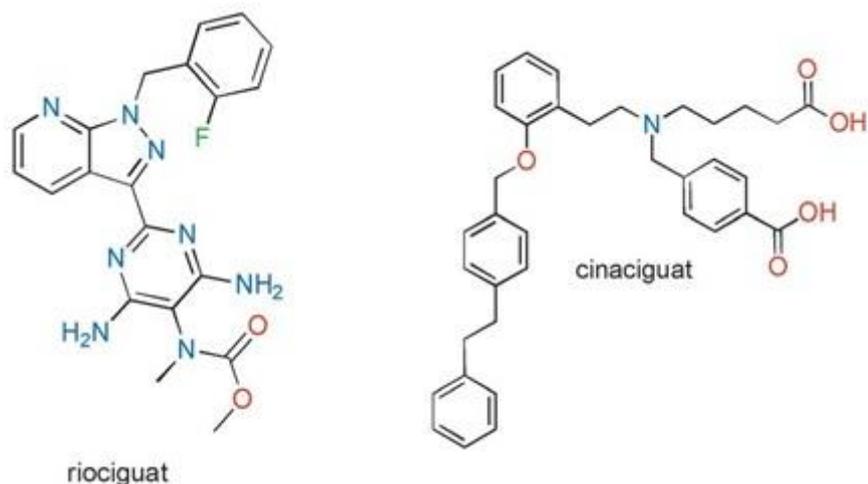


**Figura 1.5 - Ação dos estimuladores e ativadores da sGC**

Na forma nativa da enzima sGC, contendo o grupamento heme, o estimulador estabiliza o complexo nitrosil-heme (exibido no lado esquerdo) e exibe forte sinergismo com NO. Quando há alto estresse oxidativo, NO pode ser transformado em peroxinitrito, causando dano tecidual. O estresse oxidativo faz com que a sGC perca o grupamento heme, inutilizando a enzima. Assim, os ativadores atuam na forma que não possui o grupamento heme, se ligando à região onde estaria esse grupamento (exibido no lado direito) ou também podendo se ligar a esta região quando há fraca ligação do heme prostético da sGC, protegendo-a da degradação proteossomal. Tanto o estimulador como o ativador tornam a sGC ativa, independente da presença do NO, conseguindo com que esta converta o GTP em GMPc, levando à vasodilatação e proteção tecidual [91].

Desde a descoberta de tais compostos, diversos testes foram realizados, já que os cientistas estavam à procura de moléculas que induziriam a vasodilatação em condições de baixa biodisponibilidade de NO ou quando o organismo desenvolvesse tolerância a nitratos orgânicos. Os nitratos orgânicos dilatam as grandes artérias coronárias, aumentam o fluxo sanguíneo colateral, ativam fatores anti-agregantes por meio do aumento de cGMP nas plaquetas. Porém, longas exposições aos nitratos limitam a eficácia por gerar sérios efeitos colaterais, como tolerância ao composto e disfunção endotelial, prejudicando o relaxamento vascular [93]. Esse quadro é muito comum em pacientes que realizam tratamentos para hipertensão com nitratos (como por exemplo, nitroglicerina), não respondendo mais às doses que eram utilizadas no início do tratamento, necessitando de aumento da dosagem ou troca de tratamento. Diversas modificações nas estruturas químicas dos compostos foram feitas, surgindo algumas versões aperfeiçoadas tanto dos estimuladores como dos ativadores [91,92].

Atualmente, segundo as observações feitas de muitos estudos, os compostos mais promissores, isto é, com melhores respostas aos tratamentos, são o riociguat (BAY 63-2521), estimulador da sGC, e o cinaciguat (BAY 58-2667), ativador da sGC (figura 1.6). O cinaciguat foi para a fase IIb de estudos clínicos em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada aguda, mas seus testes foram parados pela dificuldade em controlar a redução da pressão sanguínea [91]. Já o riociguat foi para a fase III, mostrando-se um vasodilatador sistêmico, com ótimos resultados para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar (PAH) e hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (CTEPH) [92]. Ele possui um perfil farmacocinético superior aos outros estimuladores e boa biodisponibilidade oral entre diferentes espécies [91]. O riociguat já se encontra para vendas sob o nome de Adempas® (Bayer) para tratamento de PAH.



**Figura 1.6 – Estrutura química do riociguat e cinaciguat [91]**

Para estudar o efeito do cinaciguat *in vivo*, Thoonen e colaboradores [94] utilizaram camundongos que expressavam apenas a sGC livre de heme. Os animais desenvolveram hipertensão e os efeitos hemodinâmicos do NO foram abolidos, porém, os que foram tratados com cinaciguat voltaram a ter as respostas que seriam causadas pela presença do NO. Isso mostrou que, de fato, a regulação da pressão sanguínea, a inibição da agregação plaquetária e o relaxamento da musculatura lisa necessitam da ativação da sGC pelo NO. Também foi observado que a hipotensão e mortalidade induzida por TNF no colapso cardiovascular foram mantidas nesses animais, sugerindo que outras vias além da sinalização por sGC medeiam esse quadro durante o choque. Logo, esse modelo experimental é interessante, pois permite a diferenciação entre os efeitos da sGC dependentes e independentes do NO e entre os efeitos da sGC heme-dependente e heme-independente.

O cinaciguat já foi utilizado em variados estudos de diferentes doenças. Por exemplo, Kalk et al. [95] testaram tal droga no tratamento de ratos com nefrectomia. O composto efetivamente diminuiu a pressão sanguínea, reduziu a hipertrofia ventricular esquerda e desacelerou a progressão da doença renal, apenas usando como alvo terapêutico a sGC oxidada.

Em outro estudo, que abordou a hipótese de que o cinaciguat poderia oferecer proteção contra isquemia/reperfusão no coração, foi observado em coelhos que o pré-tratamento reduziu em 63% e 41% o tamanho do infarto e reperfusão, respectivamente, enquanto em camundongos reduziu 80% e 63%.

Também mostrou que cinaciguat aumentou a atividade da PKG miocárdial e reduziu a necrose e apoptose dos cardiomiócitos, provando que esta droga pode fornecer proteção contra isquemia/reperfusão no coração [96].

Vandendriessche e colaboradores [97] demonstraram em camundongos que o pós-tratamento com cinaciguat para choque endotóxico após 8 horas do quadro pode proteger contra letalidade. A proteção foi relacionada com diminuição da hipotermia, dos níveis de IL-6, apoptose dos cardiomiócitos e mortalidade. A estabilização da sGC com o cinaciguat preveniu a mortalidade quando dada na janela certa de tratamento, o que provavelmente depende da quantidade de sGC oxidada. Com esse estudo a equipe pode especular que, considerando o papel central da sGC em várias vias requeridas na homeostase microcirculatória, o cinaciguat auxilia as funções dos órgãos religando as vias de comunicação entre os mesmos.

Nos testes com riociguat, muitos estudos foram voltados para PAH. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Lang et al. [98], que avaliou o efeito desta droga em modelo de rato com PAH grave e comparou com os efeitos do sildenafil (vasodilatador que atua na inibição da 5-cGMP fosfodiesterase). O riociguat apresentou melhores resultados do que o sildenafil, pois diminuiu significativamente a pressão sistólica ventricular direita e a hipertrofia do ventrículo direito, aumentou o débito cardíaco, diminuiu a resistência pulmonar total, além de ter diminuído significativamente a quantidade de artérias obstruídas. Em estudos com humanos com PAH associado com doença pulmonar obstrutiva crônica, o riociguat causou melhoras significativas na média da pressão arterial pulmonar e na resistência vascular pulmonar [99].

Estudos envolvendo outros órgãos também foram realizados. Sharkovska et al. [100] investigaram os efeitos do riociguat no sistema cardio-renal em modelos de hipertensão de baixa renina e alta renina em ratos. Nos dois grupos de animais a droga normalizou a pressão sanguínea e aumentou a sobrevida. Também administraram no modelo com baixa renina um inibidor de NOS (N-nitro-L-arginina metil ester [L-NAME]) e os resultados foram redução das lesões cardíaca e renal, baixa fibrose intersticial cardíaca e renal, diminuição de glomeruloscleroses, mostrando que os efeitos observados eram independentes de NO. Portanto, o estudo mostrou em modelos diferentes de

hipertensão uma potencial proteção contra danos no coração e rins quando tratados com riociguat.

Em outro estudo com riociguat e comparando com sildenafil, foi estudado o efeito das duas drogas sobre a fibrose tecidual de diferentes etiologias. O riociguat reduziu a diferenciação de miofibroblasto e acúmulo de colágeno, mostrando potente efeito antifibrótico. Os efeitos antifibróticos foram associados com reduzida fosforilação de quinases reguladas por sinais extracelulares. O sildenafil também mostrou bons efeitos antifibróticos, porém foram significativamente menos pronunciados do que os exercidos por riociguat [101].

## 1.5 JUSTIFICATIVA

É evidente que o alto número de mortes e de indivíduos com sequelas neurológicas causadas pela MC, mesmo existindo um tratamento, demonstra a urgência do desenvolvimento de terapias adjuvantes para tratar essa doença e diminuir a incidência de sequelas nos pacientes. Como uma das principais características da MC é a vasoconstrição e a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral em um ambiente de baixa biodisponibilidade de NO, diversos estudos vêm sendo realizados para reverter esse quadro. Estudos anteriores de nosso grupo têm mostrado que a administração de compostos destinados a gerar NO em animais com MCE, em combinação com drogas antimaláricas, tem mostrado efeitos benéficos tanto na reversão da vasoconstrição cerebral quanto no aumento de sobrevivência. Apesar de bons resultados e do potencial de tais drogas como terapia adjuvante para malária cerebral, elas podem apresentar algumas desvantagens. Uma delas é a necessidade, revelada em nossos estudos, da administração de doses elevadas para obtenção dos efeitos desejados. No caso de nitroglicerina, por exemplo, as doses administradas nos animais com MCE são muito superiores às recomendadas para seu uso tradicional, por exemplo no tratamento de angina. Uma explicação para isso é o efeito *scavenger* por exemplo da hemoglobina livre, presente em níveis elevados no plasma de animais com malária devido ao processo hemolítico, e que pode estar consumindo grande parte do NO

exógeno (assim como do endógeno) administrado [89]. Além disso, sendo o NO exógeno administrado em grandes quantidades, em um ambiente muito oxidativo como no caso de animais com MCE, existe sempre o risco de que, em vez de produzir seus efeitos benéficos através de sua interação e sinalização via sGC, ele possa reagir com radicais livres e gerar moléculas deletérias como o peroxinitrito, nesse caso agravando o estresse oxidativo.

Por esses motivos, consideramos que a ativação direta da sGC (que é o propósito fundamental da administração de NO exógeno, ou da restauração de seus níveis endógenos) seria uma alternativa racional para aumentar os níveis de cGMP nos vasos sanguíneos, sem os riscos envolvidos com altas dosagens de NO. As estratégias escolhidas envolveram a administração de um estimulador de sGC (que induz ativação fazendo uso de níveis baixos de NO) e de um ativador de sGC (que induz ativação direta de sGC oxidada), e em ambos os casos foram escolhidos compostos já em fase adiantada de estudos clínicos, o riociguat e o cinaciguat. Portanto, consideramos que avaliar os efeitos destes compostos sobre a MCE pode fornecer informações valiosas, permitindo a criação de novas alternativas terapêuticas para a MC.

## **1.6 HIPÓTESE DE TRABALHO**

Devido à baixa biodisponibilidade de NO na MCE, os vasos sanguíneos cerebrais apresentam deficiência de sinalização via sGC, com baixa geração de cGMP, resultando em vasoconstrição e outros aspectos de disfunção vascular, levando a um processo isquêmico, hipóxia e morte dos animais. Nossa hipótese é que a estimulação ou ativação de sGC com riociguat ou cinaciguat vai restaurar a sinalização de sGC, gerando níveis adequados de cGMP, restaurando o fluxo sanguíneo cerebral e aumentando assim a sobrevivência de animais com MCE em estágio avançado tratados com drogas antimaláricas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar o efeito de intervenções farmacológicas baseadas na administração de um estimulador e um ativador da guanilato ciclase solúvel na malária cerebral experimental por *Plasmodium berghei* ANKA.

### **2.2 Objetivos específicos**

Em animais com MCE, determinar o efeito do estimulador de sGC riociguat e do ativador de sGC cinaciguat sobre:

- Fluxo sanguíneo cerebral;
- Permeabilidade da barreira hematoencefálica;
- Sobrevida;
- Dano cognitivo relacionado à memória de curta e longa duração, locomotividade e ansiedade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados nesse estudo camundongos fêmeas C57BL/6 com a idade de 8-10 semanas e peso aproximado de 20 gramas. Todos os animais foram produzidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) e mantidos com acesso livre a água e ração, com ciclo claro/escuro de 12 horas e sob temperatura constante de 25 °C. O uso dos animais foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz sob a licença L-037/2015 (CEUA/FIOCRUZ).

#### **3.2 Parasito e Infecção**

Os animais passagem foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com amostras descongeladas de sangue de C57BL/6 infectadas com PbA expressando a proteína fluorescente verde (PbA GFP, uma doação do Malaria Research and Reference Reagent Resource Center – MR4, Manassas, VA; depositado por C.J. Janse and A.P. Waters; MR4 number: MRA-865), previamente mantidas em nitrogênio líquido. Após 3-5 dias da infecção do camundongo passagem, 5 µL de sangue foram coletados da cauda para contagem da hematimetria e parasitemia através da microscopia de campo claro. Para infecção do grupo experimental é necessária uma maior quantidade de sangue, portanto, o animal passagem foi anestesiado com 150 µL ou mais de ketamina (100 mg/kg, Syntec) e xilazina (10 mg/kg, Syntec). Após verificação do efeito da anestesia por meio do reflexo podal, o sangue foi retirado pelo plexo orbital com uma pipeta Pasteur de vidro. Após o procedimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os animais do grupo experimental receberam por via i.p. o inóculo de 100 µL contendo  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas com PbA GFP. No 6º dia de infecção, a parasitemia dos animais foi verificada através da citometria de fluxo (BD FACsVerse™, BD Biosciences, San Diego, CA) e a temperatura corporal obtida com o auxílio de um termômetro retal (OAKTON®).

O critério para o tratamento dos animais foi a temperatura corporal, que deveria se encontrar na faixa de 32,5 °C a 36 °C, visto que a hipotermia é uma das características do quadro de MCE. Outras características da doença podiam ser observadas nesse período, como convulsões, ataxia, paralisia dos membros e coma. Nesse estágio, os animais encontram-se em MCE avançada e, caso não tratados com antimaláricos, vão a óbito em poucas horas. O tratamento com artemeter resulta em sobrevida de 30-50%. Esse protocolo experimental foi desenvolvido por nosso grupo [102] para modelar a situação clínica de pacientes que dão entrada com MC em hospitais e que requer manejo imediato pela alta gravidade e alta mortalidade. Assim sendo, permite a avaliação do efeito de intervenções adjuvantes que possam melhorar a sobrevida e diminuir a incidência e gravidade de sequelas neurológicas.

### 3.3 Drogas testadas

Os compostos utilizados nos experimentos foram:

1. Artemeter (Artesiane®, Dafra Pharma GmbH, Oftringen, Suíça), antimalárico, via i.p. na dose de 25 mg/kg (20 µL);
2. Riociguat (BAY 63-2621, BioVision, Califórnia, EUA), estimulador de sGC, 3 mg/kg a 20% DMSO via subcutânea (s.c.) (20 µL DMSO + 80 µL de salina, totalizando 100 µL por animal);
3. Cinaciguat (BAY 58-2667, BioVision, Califórnia, EUA), ativador de sGC) 300 µg/kg a 1% DMSO via s.c. (1 µL DMSO + 99 µL de salina, totalizando 100 µL por animal).

Foram testadas apenas as dosagens citadas, sempre em dose única. As drogas riociguat e cinaciguat foram diluídas previamente em DMSO, separadas em alíquotas e congeladas no freezer. As alíquotas foram descongeladas apenas no dia do experimento, logo antes de serem utilizadas, e a adição de mais DMSO e salina era realizada apenas no dia do experimento.

A escolha da dose do riociguat foi baseada nos estudos de Sharkovska et al. [100], Geschka et al. [103], Ott et al. [104] e Dees et al. [101], enquanto do cinaciguat foi no trabalho de Thoonen et al. [94].

Como controle, animais com MCE receberam artemeter i.p. 25 mg/kg (20  $\mu$ L) e 100  $\mu$ L do veículo respectivo, sem a droga.

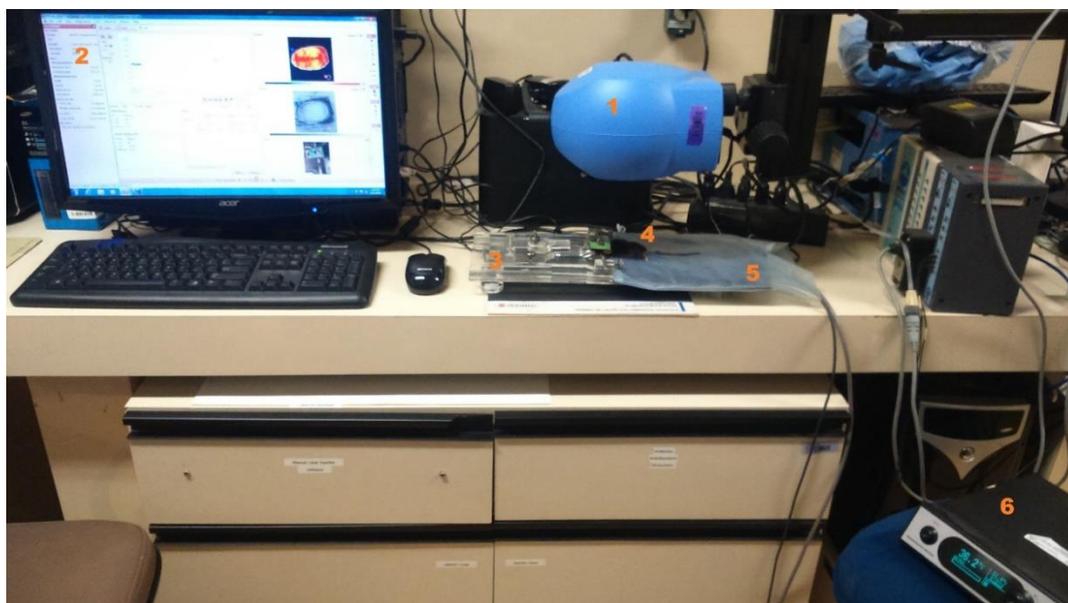
### **3.4 Medidas do fluxo sanguíneo cerebral pelo *Laser Speckle* com Contraste de Imagem (LSCI)**

O LSCI (PeriCam PSI, Primed, Järfalla, Suécia) é uma metodologia que permite medir o fluxo sanguíneo cerebral de maneira minimamente invasiva, fornecendo imageamento bidimensional do fluxo [105]. O animal é submetido à uma incisão na pele e perióstio, permitindo a exposição do crânio e, então, posicionado embaixo da câmera e do feixe de laser do aparelho, alcançando o córtex cerebral. Como o crânio dos camundongos é muito fino, não há necessidade da realização de craniotomia para medir o fluxo sanguíneo com este aparelho (figura 3.1). Os experimentos com o LSCI foram conduzidos no Laboratório de Investigação Cardiovascular, em colaboração com a Dra. Vanessa Estato e Dr. Eduardo Tibiriçá.

Uma das razões para o LSCI ter sido amplamente adotado para medir o fluxo sanguíneo é sua relativa simplicidade da instrumentação. Basicamente, o aparelho é composto por um laser, cujo feixe é expandido e ajustado para atingir a área de interesse, podendo variar de alguns milímetros até vários centímetros, e por uma câmera. As especificações das câmeras acopladas ao aparelho podem variar, sendo que até mesmo as de baixo custo têm proporcionado excelentes imagens do fluxo sanguíneo. A luz do laser é refletida para a câmera, permitindo a aquisição dos padrões granulados (*speckle*), representando a velocidade e quantidade das células sanguíneas nos microvasos cerebrais [105,106].

O LSCI gera três imagens: a primeira com o padrão *speckle* da região filmada, representando o fluxo sanguíneo cerebral em tempo real em uma escala de cores que vai do preto (0 unidade de perfusão arbitrária – UPA) ao vermelho (300 UPA); a segunda imagem em preto e branco, mostrando apenas a superfície da região filmada; a terceira sendo uma filmagem do animal sob o laser. Na imagem do padrão *speckle*, as manchas vermelhas demonstram alta

concentração de fluxo sanguíneo, enquanto as manchas pretas e azuis mostram ausência de fluxo.



**Figura 3.1 - Mensuração do fluxo sanguíneo cerebral pelo LSCI**

(1) Região do LSCI onde a câmera e o laser ficam acoplados, fornecendo e transmitindo as três imagens para o computador (2). Pelo computador pode-se configurar todos os parâmetros necessários para a mensuração. (3) Aparelho estereotáxico que fixa a cabeça do animal, evitando que a área a ser analisada saia da marcação feita no computador. (4) Camundongo fixado ao aparelho estereotáxico abaixo do laser do LSCI. (5) Manta térmica sob o camundongo ligada ao termômetro (6), mantendo sua temperatura corporal em torno de 36 °C. Pelo termômetro, pode-se controlar a temperatura desejada de aquecimento da manta.

Para realizar a mensuração do fluxo sanguíneo cerebral os animais foram anestesiados com uretano (2 mg/g i.p.; Sigma, EUA) por ser um anestésico que influencia minimamente os sistemas respiratório e cardiovascular [107]. O processo cirúrgico só pode ser iniciado após ausência do reflexo podal e a cada 20 min este foi verificado para conferir a profundidade da anestesia. Após tricotomia da cabeça e assepsia da região com Povidine®, os animais foram fixados em decúbito ventral sobre o aparelho estereotáxico para incisão do escalpo e perióstio, permitindo a exposição do crânio. O crânio foi umedecido com salina e recoberto com uma fina camada de óleo mineral para evitar o seu ressecamento. Logo após a cirurgia, o animal foi colocado sobre uma manta aquecedora a 36 °C (Harvard Apparatus) e posicionado abaixo do laser do LSCI (PeriCam PSI, Primed, Järfalla, Suécia), com

comprimento de onda de 785 nm. As medidas do fluxo foram aferidas por 20 minutos e a manta ficou aquecendo o animal durante todo o experimento.

As imagens obtidas pelo aparelho foram realizadas pelo software do fabricante (PeriCam PSI, Primed, Järfalla, Suécia) e nelas delimitada uma área de interesse de leitura do fluxo dos microvasos do córtex cerebral, denominada ROI 1. Fora da região ROI 1 foi marcada uma região para o ROI 2, sendo este o controle de ausência de fluxo sanguíneo. A distância entre o laser e a cabeça do animal foi de 10 cm, como recomendada pelo fabricante, e foram realizadas seis imagens/segundo.

Para observar os efeitos dos tratamentos alvo deste trabalho sobre o fluxo sanguíneo cerebral, foram realizadas leituras do fluxo antes e após 1 hora do tratamento. Em grupos distintos, foi realizada a análise após 6 horas do tratamento. No total, foram analisados 11 grupos:

1. Animais não infectados e não tratados (n=8);
2. Animais com MCE não tratados (n=10);
3. Animais com MCE tratados com riociguat + artemeter (n=10), leitura 1 hora após o tratamento;
4. Animais com MCE tratados com veículo do riociguat + artemeter (n=8), leitura 1 hora após o tratamento;
5. Animais com MCE tratados com artemeter (n=6), leitura 1 hora após o tratamento;
6. Animais com MCE tratados com cinaciguat + artemeter (n=10), leitura 1 hora após o tratamento;
7. Animais com MCE tratados com veículo do cinaciguat + artemeter (n=10), leitura 1 hora após o tratamento;
8. Animais com MCE tratados com riociguat + artemeter (n=10), leitura 6 horas após o tratamento;
9. Animais com MCE tratados com cinaciguat + artemeter (n=10), leitura 6 horas após o tratamento;
10. Animais com MCE tratados com veículo + artemeter (n=17), leitura 6 horas após o tratamento.

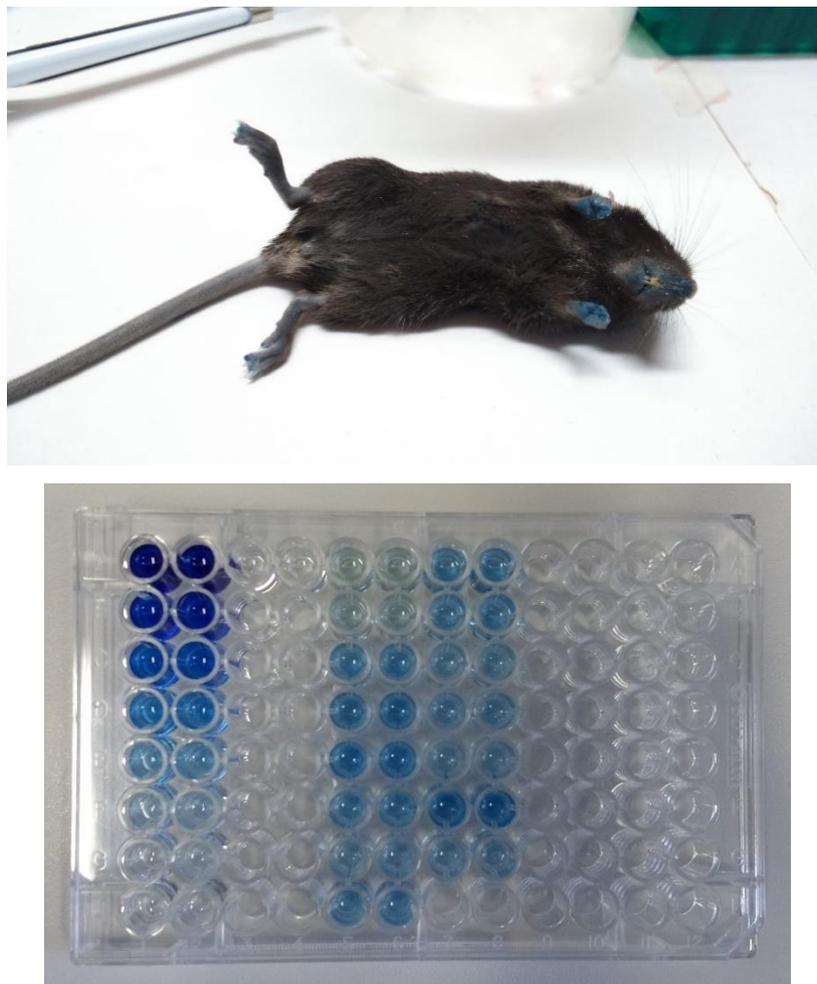
Em cada experimento, 10 animais eram inoculados e, dentre estes, os que estavam dentro dos critérios para tratamento no 6º dia de infecção foram utilizados. Os que não possuíam as características ideais para o tratamento (animais que estavam moribundos, com temperatura retal abaixo de 32,5 °C, ou animais que eventualmente não desenvolveram MCE) foram eutanasiados com overdose de pentobarbital (200 mg/kg) via i.p. Ao término do experimento, os animais utilizados foram eutanasiados por deslocamento cervical, uma vez que ainda se encontravam sob o efeito do anestésico uretano.

### **3.5 Análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica**

O corante azul de Evans é amplamente usado para pesquisar aumento de extravasamento vascular, incluindo o rompimento da barreira hematoencefálica. Como o azul de Evans pode ser facilmente visto a olho nu, indicando grosseiramente a sua distribuição, talvez seja o motivo de ainda ser o corante mais usado para o estudo da integridade da barreira hematoencefálica [108]. Outra vantagem desse corante é sua permanência relativamente estável no sangue, não sendo excretado facilmente.

No 6º dia de infecção, os animais que estavam com a temperatura entre 32,5 e 36 °C receberam aleatoriamente algum dos seguintes tratamentos: riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.) (n=6), cinaciguat (s.c.) + artemeter (i.p.) (n=10) ou veículo do cinaciguat (s.c.) + artemeter (i.p.) (n=12), nas concentrações indicadas no item 3.4. Cinco horas após o tratamento, os animais foram anestesiados com uretano (2 mg/g i.p.; Sigma, EUA) e receberam 150 µL do corante azul de Evans (Sigma) a 2%, diluído em PBS, por via intra-ocular. Após 1 hora da inoculação do corante, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram seus cérebros removidos. Os cérebros foram armazenados em tubos Falcon contendo 3 mL de formamida (Sigma) e ficaram por 48 horas na estufa (Nova Ética) a 37 °C. A absorvância do sobrenadante de cada amostra foi obtida por meio do espectrofotômetro (Spectra MAX 190, Molecular Devices) a 620 nm. Animais controles não infectados e não tratados (n=6) e animais com MCE não tratados (n=11) também receberam os mesmos procedimentos para coloração e extração dos cérebros (figura 3.2).

Para esses experimentos, grupos entre 20 e 25 animais foram inoculados e, dentre estes, os que estavam dentro dos critérios para tratamento no 6º dia de infecção foram utilizados. Os que não possuíam as características ideais para o tratamento foram eutanasiados com overdose de pentobarbital (200 mg/kg) via i.p.



**Figura 3.2 - Experimento com azul de Evans para análise da permeabilidade da barreira hematoencefálica**

Na primeira imagem, camundongo anestesiado da linhagem C57BL/6 após injeção do corante azul de Evans. Na segunda, placa contendo o sobrenadante de cada amostra para ser lida no espectrofotômetro. As duas primeiras colunas são de diluições seriadas para formar uma curva padrão e as colunas 5 a 8 com os sobrenadantes das amostras.

### 3.6 Ensaio de sobrevida

O ensaio de sobrevida consiste em um regime de tratamento por certo período de tempo, podendo quantificar o número de animais que sobrevivem àquele tratamento. No 6º dia de infecção, todos os animais tiveram suas temperaturas mensuradas pela manhã e os que estavam entre 32,5 e 36 °C receberam aleatoriamente algum tratamento, sendo: riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.) ou veículo do riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.), nas concentrações indicadas no item 3.4. Os animais receberam durante cinco dias consecutivos uma dose de artemeter e, nos dois primeiros dias do tratamento, também receberam uma dose de riociguat ou do veículo por dia. O tratamento se deu no período da manhã e, em todos os cinco dias, 3 µL de sangue da cauda eram coletados para verificação da parasitemia por citometria de fluxo. Esse protocolo de tratamento foi baseado no estudo de Clemmer et al. [102].

Animais tratados que se tornaram moribundos, com temperatura retal abaixo de 30 °C ou apresentando sinais como coma profundo ou dificuldades respiratórias, foram submetidos à eutanásia com overdose de pentobarbital (200 mg/kg) via i.p. Animais encontrados mortos nas gaiolas eram retirados da gaiola e o horário era anotado, para posteriormente ser adicionado à curva de sobrevida.

Os grupos experimentais foram formados por 40 animais. Os animais que não possuíam as características ideais para o tratamento foram eutanasiados com overdose de pentobarbital (200 mg/kg) via i.p. e os que sobreviveram ao regime de tratamento foram submetidos aos testes de comportamento.

Os animais controles não infectados receberam PBS durante os dias de tratamento dos outros animais, para passarem pelos mesmos procedimentos que os animais infectados tratados, também se acostumando a serem manipulados e ficarem menos estressados ao serem submetidos aos testes de comportamento.

### **3.7 Testes de comportamento**

A habilidade de discriminar novos estímulos daqueles já previamente conhecidos é uma habilidade básica necessária para a sobrevivência animal. Há décadas os cientistas vêm desenvolvendo métodos para examinar essa habilidade dos animais em reconhecer objetos familiares e reconhecer as estruturas cerebrais que contribuem para o reconhecimento [109].

Neste estudo, foram realizados nos animais sobreviventes ao ensaio de sobrevivência três diferentes testes comportamentais: teste do campo aberto, para analisar memória de habituação ou de longo prazo, locomotividade e ansiedade; teste do reconhecimento de objetos, para avaliar memória de longo prazo; teste de esQUIVA inibitória, para estudar memória de longo prazo. Os testes foram realizados no biotério do pavilhão Leônidas Deane, sempre no início da tarde e nas mesmas condições, em uma sala que teve a luz externa vedada, com lâmpadas amarelas de iluminação mais fraca e com a mínima interferência de barulhos [110]. Os animais em suas gaiolas foram expostos a esse ambiente 1 hora antes do início dos testes para se habitarem ao local. A parasitemia dos animais foi acompanhada no primeiro e no último dia do teste, com a coleta do sangue sendo feita após a realização do teste do dia para não estressar os animais, já que o estresse pela manipulação poderia ser um viés nos testes.

Os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos foram filmados e com seus dados gravados pelo programa *Any-maze Behaviour Tracking Software*<sup>TM</sup> (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, E.U.A.), o qual possui opções de análises para diferentes tipos de teste comportamental. Tais testes foram conduzidos em parceria com a doutoranda Luciana Sousa e Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro do Laboratório de Pesquisa em Malária.

#### **3.7.1 Teste do campo aberto**

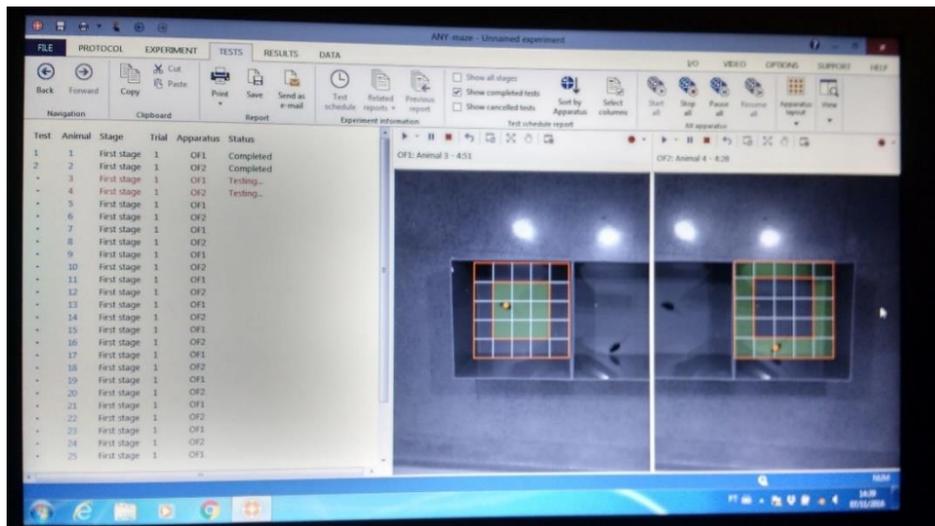
O teste do campo aberto é utilizado para analisar o comportamento baseado em situações de conflitos naturais, isto é, o conflito entre a exploração e aversão ao ambiente aberto [111]. Desse modo, pode ser usado para estudar

a atividade locomotora geral, exploração de novos ambientes, comportamento de estresse, territorialidade e balanço autonômico em roedores, medindo simultaneamente todos estes parâmetros. Os animais mais ansiosos tendem a permanecer perto das paredes da arena, enquanto os menos ansiosos preferem a área central [112,113].

No 3º dia após término do tratamento os animais foram submetidos à primeira sessão do teste de campo aberto. Dois aparatos opacos idênticos feitos de acrílico na cor cinza, de 50x50x50 cm, foram posicionados lado a lado sob uma câmera, que por sua vez estava conectada ao computador com o programa Any-maze™. Todos os animais foram colocados sempre no mesmo canto do aparato e puderam explorar o local por 10 minutos cada. Ao término do teste de cada animal, este voltava à sua gaiola e o aparato era limpo com álcool 70%.

No computador, uma grade contendo 25 quadrados foi arrumada para a encaixar exatamente na área do aparato a ser explorada, sendo que no meio do aparato foi demarcada uma área central, com nove quadrados, e a área ao redor desta, denominada periferia, com 16 quadrados. A demarcação das áreas de periferia e central são importantes para analisar se o animal está ou não com comportamento ansioso (figura 3.3). O animal era identificado e marcado pelo programa, que contava qual a distância que ele percorreu, quantas vezes entrou e saiu de cada área, qual o tempo de permanência em cada área, por quanto tempo ficou imóvel, entre outros [112-114].

No dia seguinte da primeira sessão, ou seja, no 4º dia após término do tratamento, os animais foram submetidos a uma nova sessão, com todos os parâmetros idênticos aos do dia anterior.



**Figura 3.3 - Teste do campo aberto pelo programa Any-maze™**

A filmagem dos dois aparatos na sala é transmitida para o computador com o programa, que irá gerar todas as informações acerca de cada teste. Uma grade foi montada acima da imagem de cada aparato, delimitando as suas áreas da periferia e centro. O animal é reconhecido pelo programa e marcado com uma bolinha laranja. Quando a bolinha entra na área periférica ou central, a área fica verde.

Para analisar os resultados, foram consideradas as contagens realizadas pelo Any-maze™ sobre a distância total percorrida no aparato em metros e o tempo de permanência na área central em segundos. A distância total percorrida na primeira sessão do campo aberto permite avaliar a locomotividade do animal, já que o animal costuma explorar mais na primeira sessão, enquanto a comparação desta com a segunda sessão do teste permite avaliar a memória de habituação. Para avaliar se o animal possui comportamento ansioso, usa-se o tempo de permanência na região central do aparato da primeira sessão do teste, uma vez que o animal, não conhecendo o local, mostra como se comporta perante a um 'obstáculo maior', a um novo desafio [112-114].

### 3.7.2 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos se baseia no princípio de que os roedores têm uma tendência natural a explorar preferencialmente objetos novos [112]. No 15º dia pós-infecção os camundongos foram submetidos a sessão de treinamento da tarefa de reconhecimento de objetos. No mesmo aparato em que foi realizado o teste de campo aberto, foram posicionadas

igualmente duas garrafas de vidro *long neck* vazias de cor âmbar idênticas, isto é, as duas com a mesma distância das paredes do aparato. Os aparatos também ficaram posicionados da mesma forma do que no teste anterior, sendo filmados pela câmera e os dados processados pelo Any-maze™. Todos os animais foram colocados no mesmo canto do aparato, de forma que iniciassem o teste com a mesma distância de cada objeto. Os animais exploraram a arena e os objetos por 10 minutos e depois foram retirados e devolvidos para suas respectivas gaiolas. Nessa sessão, os animais deveriam explorar igualmente os dois objetos, para excluir qualquer viés de preferência por algum dos objetos ou local do aparato. Os animais que não exploraram de maneira similar os dois objetos e os controles não infectados que exploraram por menos de 10 minutos cada objeto foram excluídos das análises [115].

No dia seguinte, 24 horas depois da sessão de treinamento, os animais foram submetidos a uma nova sessão de 10 minutos de duração. Nessa nova sessão, denominada sessão teste, um dos objetos de cada aparato foi trocado por um novo, uma garrafa de plástico transparente contendo refrigerante cor laranja, sendo posicionado exatamente no mesmo local do objeto anterior. Ou seja, esse novo objeto possuía textura e tamanho diferentes do objeto já familiar (figura 3.4).



**Figura 3.4 - Sessão teste do reconhecimento de objetos**

Os dois objetos foram igualmente posicionados nos dois aparatos, sendo que o objeto novo ficou exatamente no mesmo local do objeto familiar da sessão treino.

Ambas as sessões foram filmadas, porém, os dados foram obtidos por meio da cronometragem manual dos vídeos gerados. Com um cronômetro para cada objeto presente no aparato, cada vez que o camundongo encostava em alguma das garrafas ou se aproximava em menos de 2 cm do objeto, o cronômetro era acionado e deveria contar pelo menos um segundo. Se o animal permanecia mais tempo explorando o objeto, o cronômetro ficaria ativado por todo o tempo de exploração, só sendo pausado quando o animal deixava o objeto. Nessa sessão, espera-se que os animais explorem mais o objeto novo do que o familiar, mostrando que houve aprendizado e aquisição de memória de longo prazo. Ao final de todas as sessões, o aparato foi limpo com álcool 70%.

### **3.7.3 Teste de esquiva inibitória**

No 17º dia pós-infecção os animais participaram do teste de esquiva inibitória. Esse teste consiste em fornecer um choque nas patas do animal, o que pode ser usado tanto para gerar estresse físico como psicológico. Existem diferentes protocolos para sua realização, alterando a duração, intensidade e exposição ao choque, produzindo um estresse leve ou severo, de natureza aguda ou crônica [113].

Primeiramente, eles foram colocados sobre uma plataforma dentro de uma caixa de alumínio (Insight EP 104C) com tamanho 200x75 mm. Abaixo da plataforma há uma grade de barras de aço (3 mm de diâmetro, com espaçamento de 7 mm) que, ligada a um aparelho, fornece um choque no animal quando acionada (figura 3.5). Assim que o animal era posto sobre a plataforma, o cronômetro era ativado e só podia ser pausado quando o animal descia as quatro patas para a grade e, quando isso acontecia, o aparelho era acionado e o animal recebia um choque de 0,5 mA durante 3 segundos [116]. Logo após, o camundongo era devolvido à sua gaiola.

Após 3,5 horas, os animais foram submetidos a uma nova sessão do teste, que se deu da mesma forma que a anterior, porém, não ocorrendo outro choque. Nessa sessão apenas foi cronometrado o tempo de descida do animal à grade e, logo em seguida, este era devolvido à sua gaiola. É esperado que o

animal demore mais tempo para descer à grade do que na primeira sessão, mostrando que ele processou o estímulo (no caso, o choque) e adquiriu uma memória de curto prazo.

Ao término desse teste, os animais tiveram o sangue coletado para acompanhamento da parasitemia e foram eutanasiados com overdose de pentobarbital (200 mg/kg) via i.p.



**Figura 3.5 - Teste de esquiva inibitória**

O animal foi posicionado em cima da plataforma presente na caixa e, quando todas as patas desciam até a grade, um choque era acionado pelo aparelho ligado à caixa.

### **3.8 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, Califórnia, E.U.A.). Nos experimentos de mensuração de fluxo sanguíneo cerebral, foram utilizados o teste t não pareado para análise de grupos distintos e o Mann-Whitney para animais de um mesmo grupo. No experimento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, utilizou-se o teste one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey. No ensaio de sobrevivência foi empregado teste de Log-Rank (Mantel-Cox) para criação da curva. Nos testes de comportamento, usou-se one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey nas análises que continham apenas um fator de cada grupo de tratamento, enquanto o two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi empregado nas análises que envolviam dois fatores em cada grupo. Para os valores serem considerados significativos, o P valor deveria ser  $< 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

Os experimentos conduzidos para a realização desse projeto foram desenhados com base em protocolo desenvolvido por nosso grupo para avaliação de terapias adjuvantes para MCE [102]. Nesse protocolo, para que os animais sejam considerados aptos para o tratamento, é necessário que apresentem a forma grave característica da MCE. Entretanto, essa síndrome neurológica pode se apresentar de diferentes formas em cada animal (exemplo: alguns apresentam convulsões e *roll over* sem outras manifestações evidentes, outros desenvolvem ataxia, ou paralisia de patas, outros podem evoluir rapidamente para coma etc.). Além disso, em determinado momento os animais em um grupo infectado por PbA podem apresentar manifestações neurológicas em diferentes estágios, alguns com sinais iniciais e outros em estado terminal, moribundos. Isso traz complicações para o estabelecimento dos critérios para tratamento, uma vez que o desfecho pode ser muito diferente dependendo do grau de comprometimento neurológico de cada animal, gerando grande potencial para introdução de vieses ao recrutar animais para os diferentes grupos experimentais (exemplo: grupo tratado com determinada droga e grupo controle). Para contornar esse problema, o protocolo descrito por nosso grupo estabeleceu um parâmetro objetivo para "estagiar" a síndrome neurológica e homogeneizar os grupos de tratamento. Esse parâmetro objetivo é a temperatura retal, uma vez que os animais que fazem MCE consistentemente apresentam hipotermia progressiva e, na ausência de tratamento, irão a óbito com temperaturas corporais abaixo de 30 °C. Determinamos que a faixa ideal de temperatura retal para tratamento fica entre 32,5 °C e 36 °C. Abaixo de 32 °C (MCE muito avançada) o tratamento com o antimalárico artemeter é muito pouco eficaz e a letalidade é muito alta. Ao contrário, acima de 36 °C (MCE em estágio relativamente inicial) o tratamento com artemeter é muito eficaz, com letalidade muito baixa. Na faixa entre 32,5 e 36 °C já determinamos que a sobrevivência dos animais tratados com artemeter fica entre 30 e 50%. Isso permite uma maior eficiência na avaliação da eficácia de tratamentos adjuvantes ao artemeter, requerendo um número menor de

animais para tais experimentos. Permite também que se mimetize melhor as condições em que pacientes com malária cerebral são tratados.

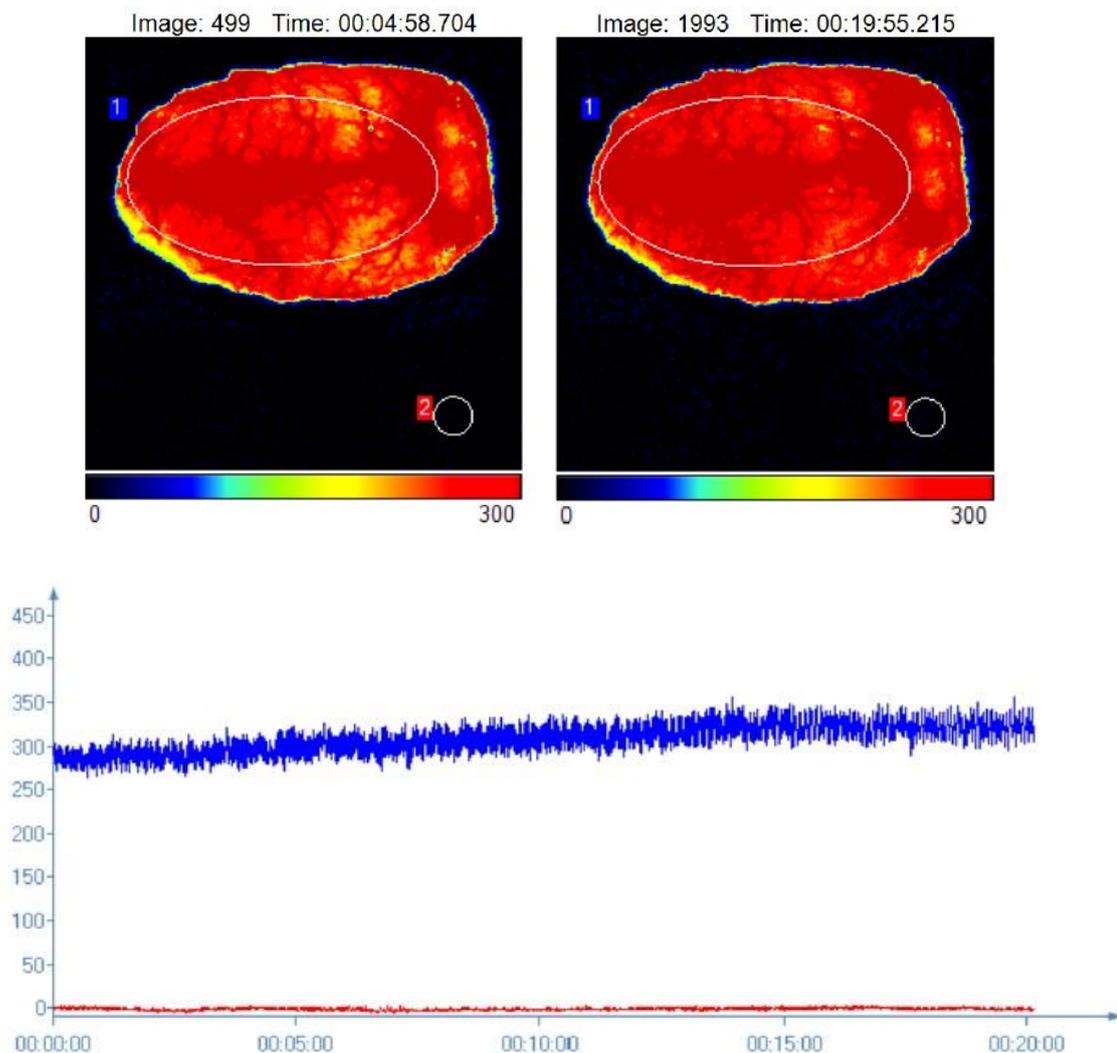
Entretanto, a limitação imposta por esse critério de seleção faz com que, de um grupo de animais infectados com PbA, eventualmente apenas uma fração será de fato recrutada para os experimentos. Isso ocorre porque no dia 6 de infecção, quando nas nossas condições a maioria dos animais desenvolve MCE, no momento em que se faz a checagem dos animais (por volta de 7 horas da manhã), alguns ou muitos podem já estar em estágio mais avançado ( $< 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e por isso são descartados (submetidos à eutanásia). Além disso, em alguns experimentos como o de LSCI para avaliação de fluxo sanguíneo cerebral, existe a limitação do uso do equipamento, como o tempo de utilização. Com isso, em determinado dia, apenas um número limitado de animais pode ser avaliado. Além disso, animais que se apresentem em condições de serem recrutados no início do dia podem evoluir rapidamente para um estágio no qual, no momento em que possam de fato serem avaliados, isso já não seja mais possível. A consequência dessas limitações é que existe a necessidade de realização de vários experimentos para obtenção de dados de uma única medida, o que foi a realidade vivida na condução do presente estudo.

Nossos experimentos mostraram-se bastante reprodutíveis em termos de incidência e *timing* de incidência de MCE, com a vasta maioria dos animais inoculados desenvolvendo de fato a síndrome neurológica e, também em sua grande maioria, já na manhã do dia 6 de infecção. Os animais que preenchiam o critério básico de inclusão para tratamento foram distribuídos nos diferentes grupos de tratamento de forma aleatória, e a homogeneidade dos grupos em relação tanto à temperatura retal quanto aos níveis de parasitemia foram verificados a posteriori.

## 4.1 Fluxo sanguíneo cerebral

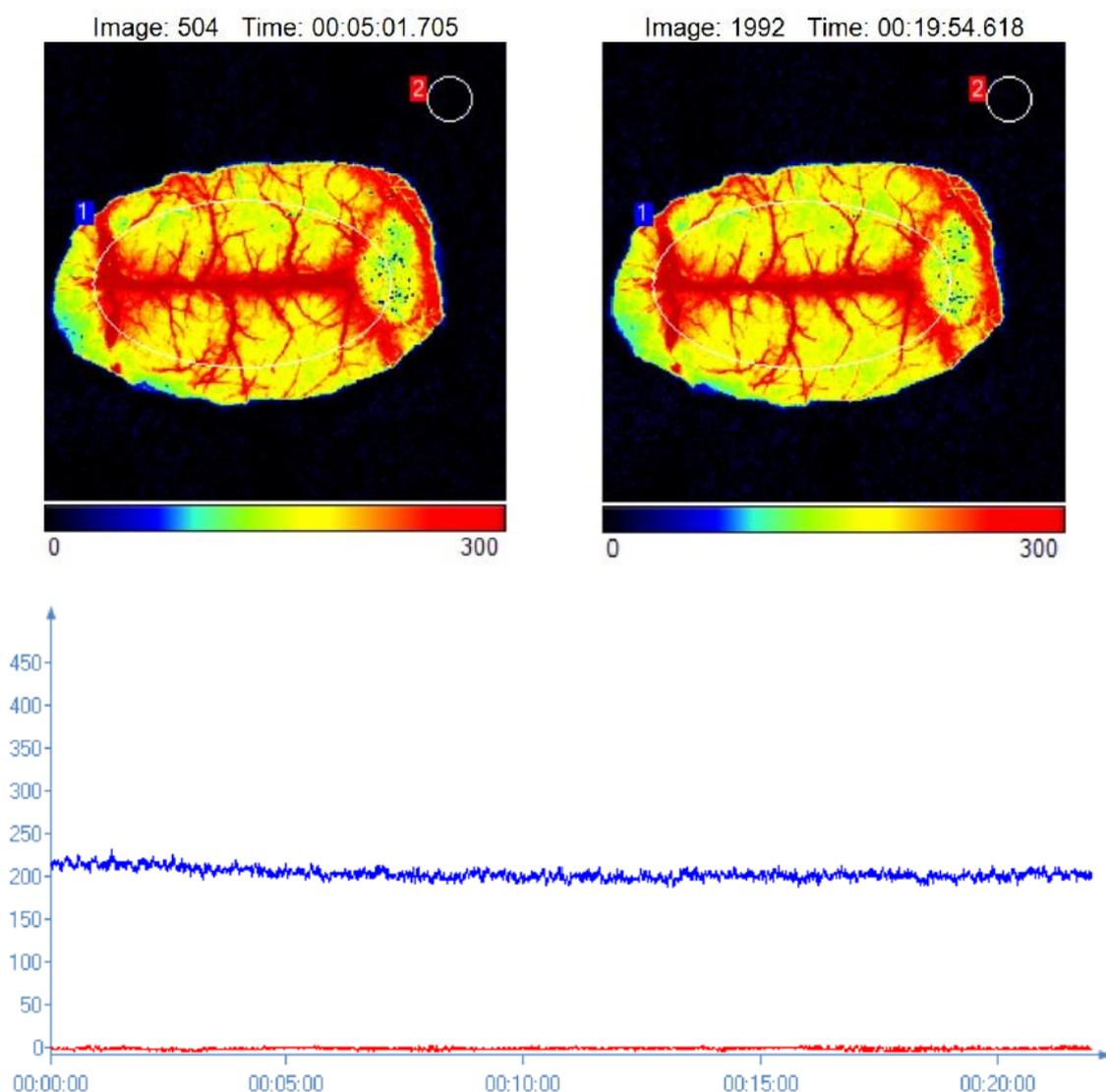
### 4.1.1 Fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE e controles não infectados

Inicialmente, foi avaliado o fluxo sanguíneo cerebral de animais controle não infectados. Os valores de fluxo foram registrados durante 20 minutos e se mantiveram constantes do início ao fim da aquisição das imagens (figura 4.1). A medida de fluxo sanguíneo cerebral dos animais com MCE não tratados mostrou grande redução no fluxo sanguíneo cerebral em comparação com o grupo controle (figura 4.2). Na figura 4.3, pode-se observar que há diferença significativa entre os grupos não infectados e os com MCE não tratados, com P valor < 0.0001.



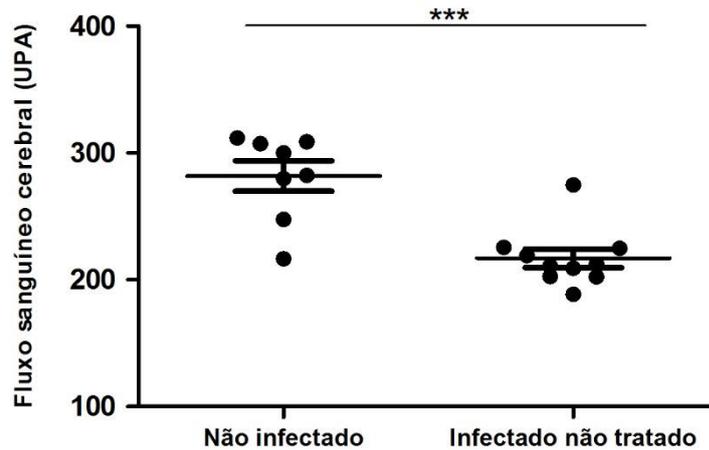
#### Figura 4.1 – Fluxo sanguíneo cerebral de animal não infectado

Na figura de cima, imagens do fluxo sanguíneo cerebral através do padrão *speckle* de um animal não infectado em dois momentos, após 5 minutos e 20 minutos do início do registro. As medidas são feitas em uma área de interesse previamente demarcada por uma linha oval (ROI 1), e medidas do background são feitas simultaneamente em uma área contígua demarcada por um círculo (ROI 2). Na figura abaixo, registro contínuo referente ao fluxo sanguíneo cerebral durante 20 minutos da ROI 1 (média do fluxo: 307.37 - valores em Unidade de Perfusão Arbitrária [UPA]). A linha vermelha é referente à medida do background (ROI 2), estável durante toda a mensuração.



#### Figura 4.2 – Fluxo sanguíneo cerebral de um animal infectado com MCE

Na figura de cima, imagens do fluxo sanguíneo cerebral através do padrão *speckle* de um animal não infectado em dois momentos, após 5 minutos e 20 minutos do início do registro. As medidas são feitas em uma área de interesse previamente demarcada por uma linha oval (ROI 1), e medidas do background são feitas simultaneamente em uma área contígua demarcada por um círculo (ROI 2). Na figura abaixo, registro contínuo referente ao fluxo sanguíneo cerebral durante 20 minutos da ROI 1 (média do fluxo: 202.53 UPA - valores em Unidade de Perfusão Arbitrária [UPA]). A linha vermelha é referente à medida do background (ROI 2), estável durante toda a mensuração.



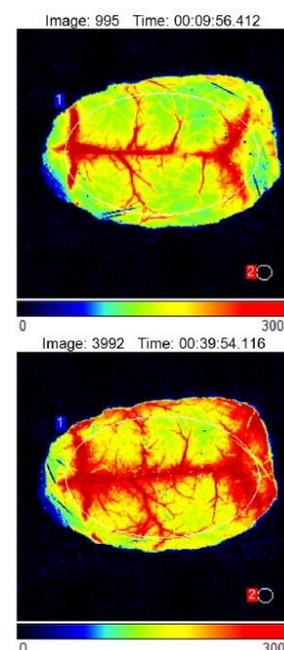
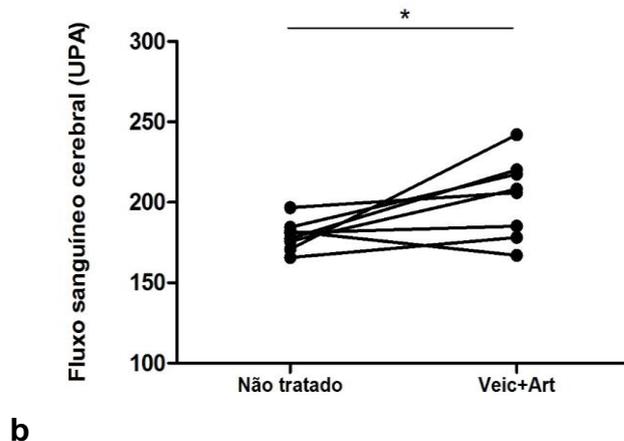
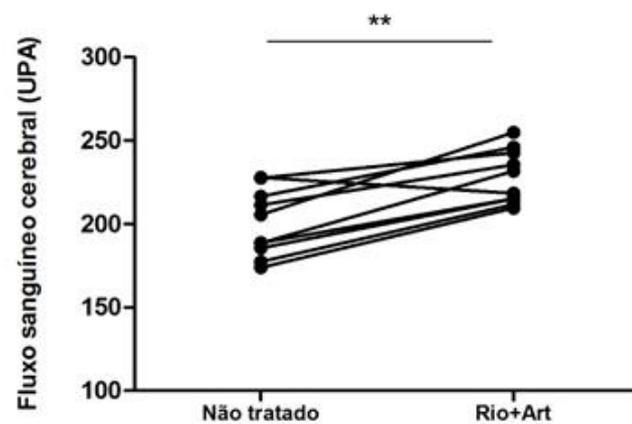
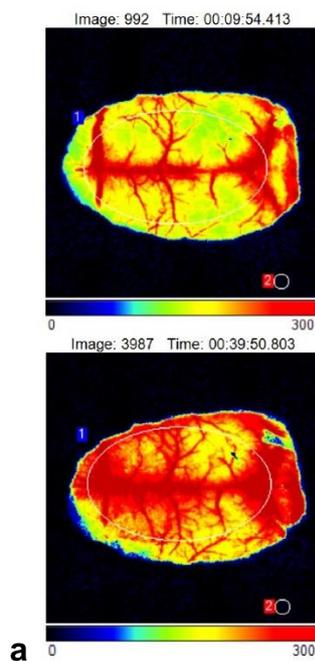
**Figura 4.3 – Fluxo sanguíneo cerebral de animais não infectados e infectados não tratados**

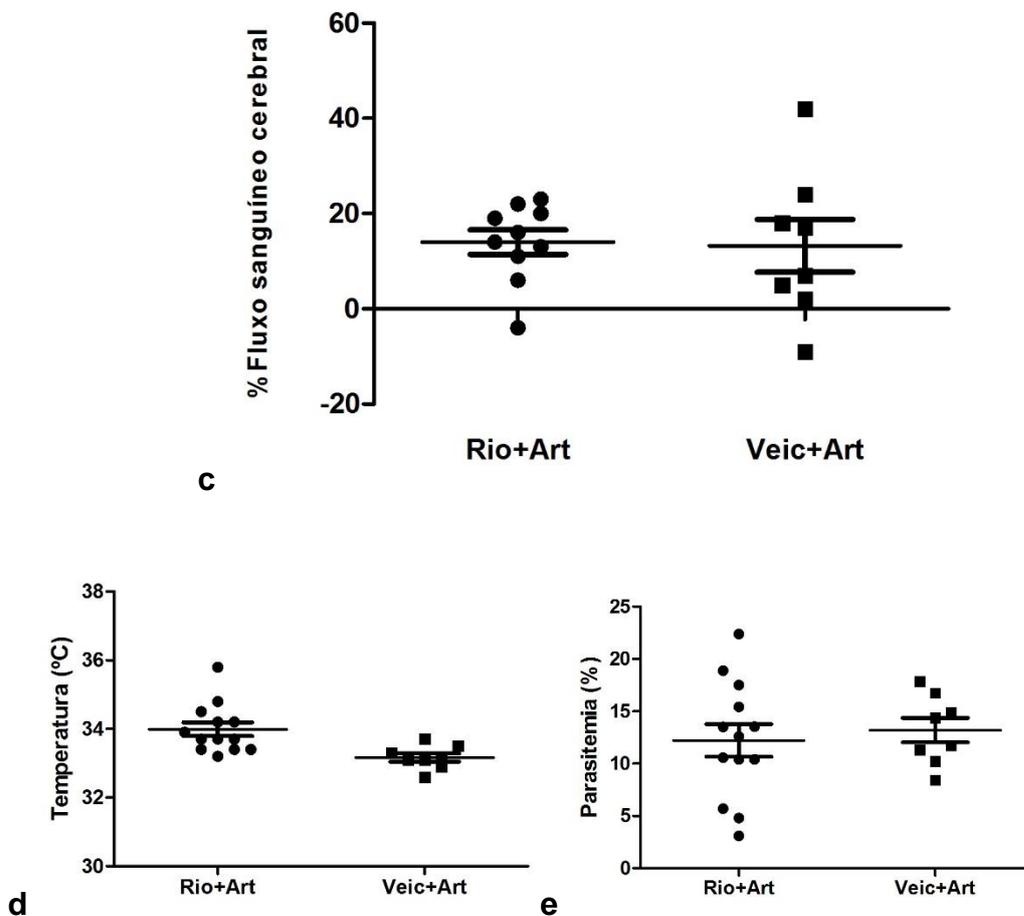
Gráfico representativo do fluxo sanguíneo cerebral (UPA) de animais não infectados e não tratados ( $n=8$ ) e de animais com MCE não tratados ( $n=10$ ). Há diferença significativa entre os grupos, com grande queda do fluxo nos animais com MCE não tratados ( $P$  valor  $< 0.0002$  - teste  $t$  não pareado).

#### 4.1.2 Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter e riociguat

Em um primeiro experimento, animais com MCE foram anestesiados com uretano e tiveram o fluxo sanguíneo cerebral medido por 20 minutos (fluxo basal). Ao término da mensuração, os animais receberam o tratamento do riociguat (3 mg/kg, s.c.) e artemeter (25 mg/kg, i.p.). Após 1 hora do tratamento, os animais foram expostos novamente ao LSCI para mensuração. Na figura 4.4a pode-se observar que ocorreu aumento significativo do fluxo na maior parte dos animais ( $P$  valor = 0.0068). Como controle, um segundo grupo de animais também teve seu fluxo basal medido antes do tratamento e 1 hora depois, mas neste caso os animais não receberam a droga adjuvante, ou seja, foram tratados com artemeter (i.p.) e veículo (s.c.). Este grupo também apresentou aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral ( $P$  valor = 0.0379) (figura 4.4b). Não houve diferença significativa na intensidade do aumento de fluxo sanguíneo induzido pelos dois tipos de tratamento (artemeter com ou sem riociguat –  $P$  valor = 0.8971) (figura 4.4c). Ou seja, o riociguat, na dose de 3 mg/kg, não produziu um efeito superior ao veículo sobre o fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE 1 hora após a administração. A análise a posteriori da parasitemia e temperatura mostrou que os dois grupos

eram homogêneos no que se refere aos níveis de parasitemia, mas foi observada uma pequena diferença (0,8 °C na média, P valor = 0.0068) entre o grupo que recebeu riociguat e o que recebeu veículo. Constata-se assim que os animais do grupo que recebeu veículo apresentavam-se com MCE em estágio ligeiramente mais avançado do que os que receberam riociguat, embora todos os animais tenham sido tratados na faixa de temperatura pré-determinada.





**Figura 4.4 - Fluxo sanguíneo cerebral antes e após 1 hora de tratamento com riociguat + artemeter**

(a) Primeiramente, o grupo teve seu fluxo sanguíneo mensurado por 20 minutos e ao término desse período recebeu o tratamento de riociguat + artemeter (n=10). Após 1 hora do tratamento, os animais foram expostos novamente ao LSCI para mensuração por 20 minutos. O fluxo sanguíneo cerebral aumentou significativamente (P valor = 0.0068, teste de Mann-Whitney) em comparação com o fluxo basal. No lado esquerdo, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração antes e após o tratamento e, do lado direito, gráfico com as medidas de ambos os momentos de análise. (b) Assim como o grupo anterior, os animais tiveram seu fluxo sanguíneo cerebral medido antes e 1 hora após receberem o tratamento de veículo + artemeter (n=8). Houve aumento significativo do fluxo (P valor = 0.0379, teste de Mann-Whitney). No lado esquerdo, gráfico com as medidas de ambos os momentos de análise e, do lado direito, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração antes e após o tratamento. (c) Comparação da porcentagem de aumento ou diminuição dos valores obtidos do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora do tratamento entre os grupos tratados com riociguat + artemeter e veículo + artemeter. Não houve diferença significativa entre os grupos (P valor = 0.8971, teste t não pareado). (d) Parasitemia de ambos os grupos com médias próximas a 13%, não havendo diferença significativa (P valor = 0.6619; teste t não pareado). (e) Temperatura do grupo tratado com riociguat (média de 34 °C) e tratado com veículo (média de 33,2 °C) com diferença significativa (P valor = 0.0068; teste t não pareado).

Em uma próxima etapa, os animais receberam o tratamento com as mesmas drogas, isto é, riociguat + artemeter ou veículo + artemeter,

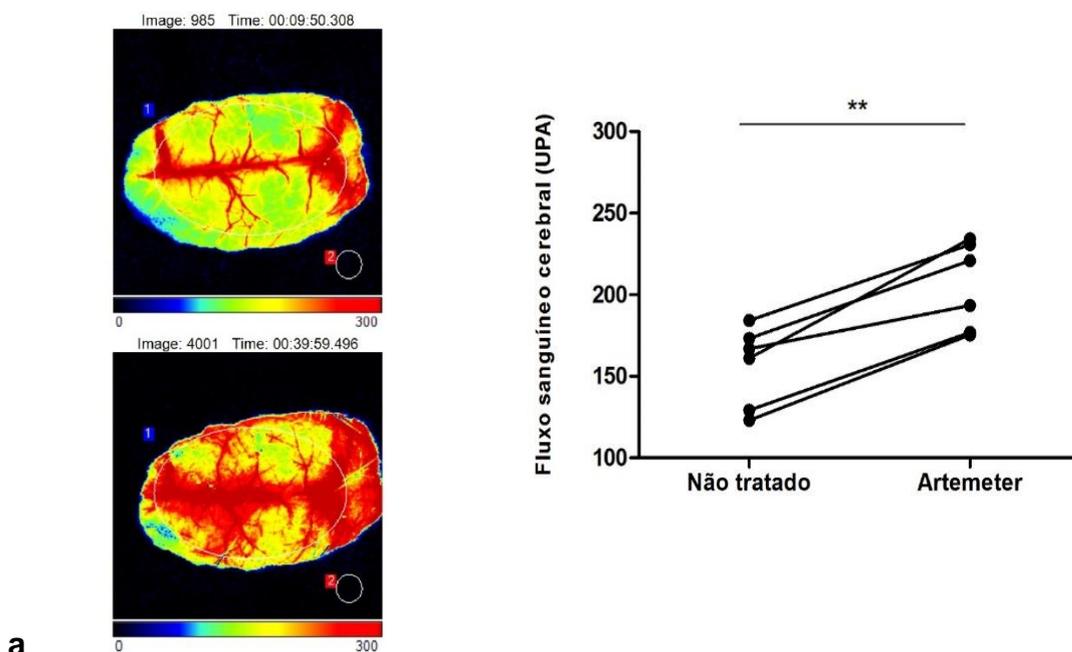


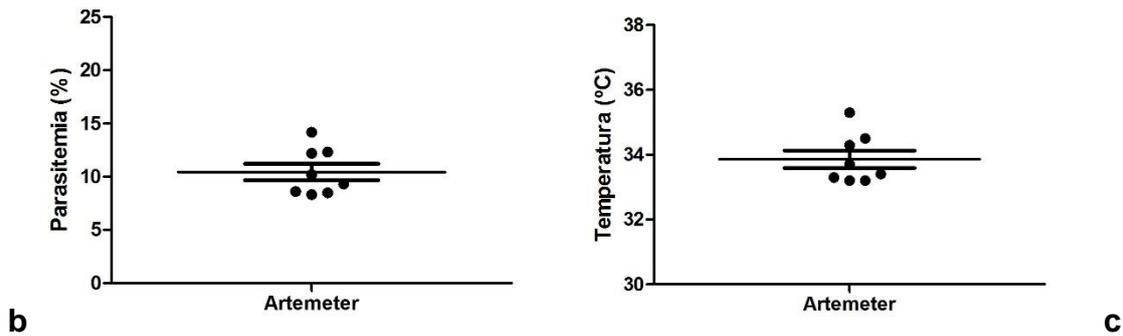
#### Figura 4.5 - Fluxo sanguíneo cerebral 6 horas após o tratamento nos grupos tratados com riociguat + artemeter e veículo + artemeter

(a) O grupo tratado com riociguat + artemeter (n=10) apresentou fluxo sanguíneo significativamente mais elevado que o grupo veículo + artemeter (n=17) (P valor = 0.0078, t teste não pareado). No lado esquerdo, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração no tratamento com riociguat (acima) e veículo (abaixo) e, do lado direito, gráfico com as medidas de ambos os grupos. (b) Parasitemia dos dois grupos com média aproximada de 13%, não havendo diferença significativa (P valor = 0.8326; teste t não pareado). (c) Temperatura de ambos os grupos, com médias aproximadas em 34 °C, não ocorrendo diferença significativa (P valor = 0.3092; teste t não pareado).

#### 4.1.3 Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter

Como o tratamento com riociguat + artemeter resultou no mesmo aumento de fluxo da administração de veículo + artemeter, foi feito um grupo controle infectado tratado apenas com artemeter (25 mg/kg) para verificar se a reposição de líquido ou o próprio artemeter que influenciou nesse aumento. Na figura 4.6 pode-se observar que também ocorreu aumento significativo do fluxo sanguíneo, mesmo com apenas 20 µL de artemeter (i.p). Esse dado mostra que o artemeter por si só já gera aumento do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora de sua administração.





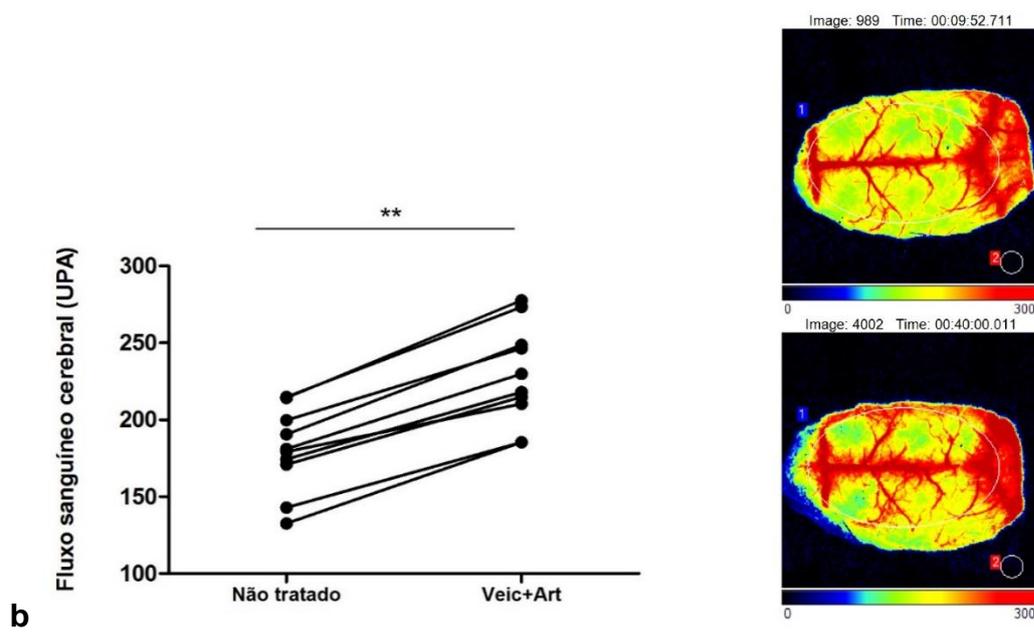
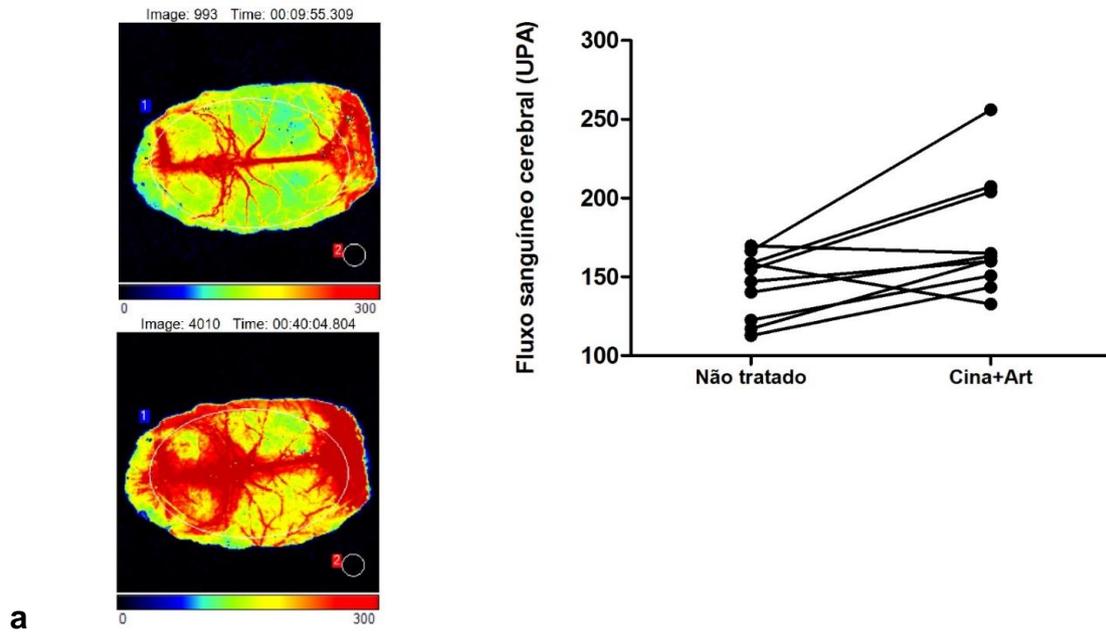
**Figura 4.6 – Efeito do artemeter no fluxo sanguíneo cerebral após uma hora**

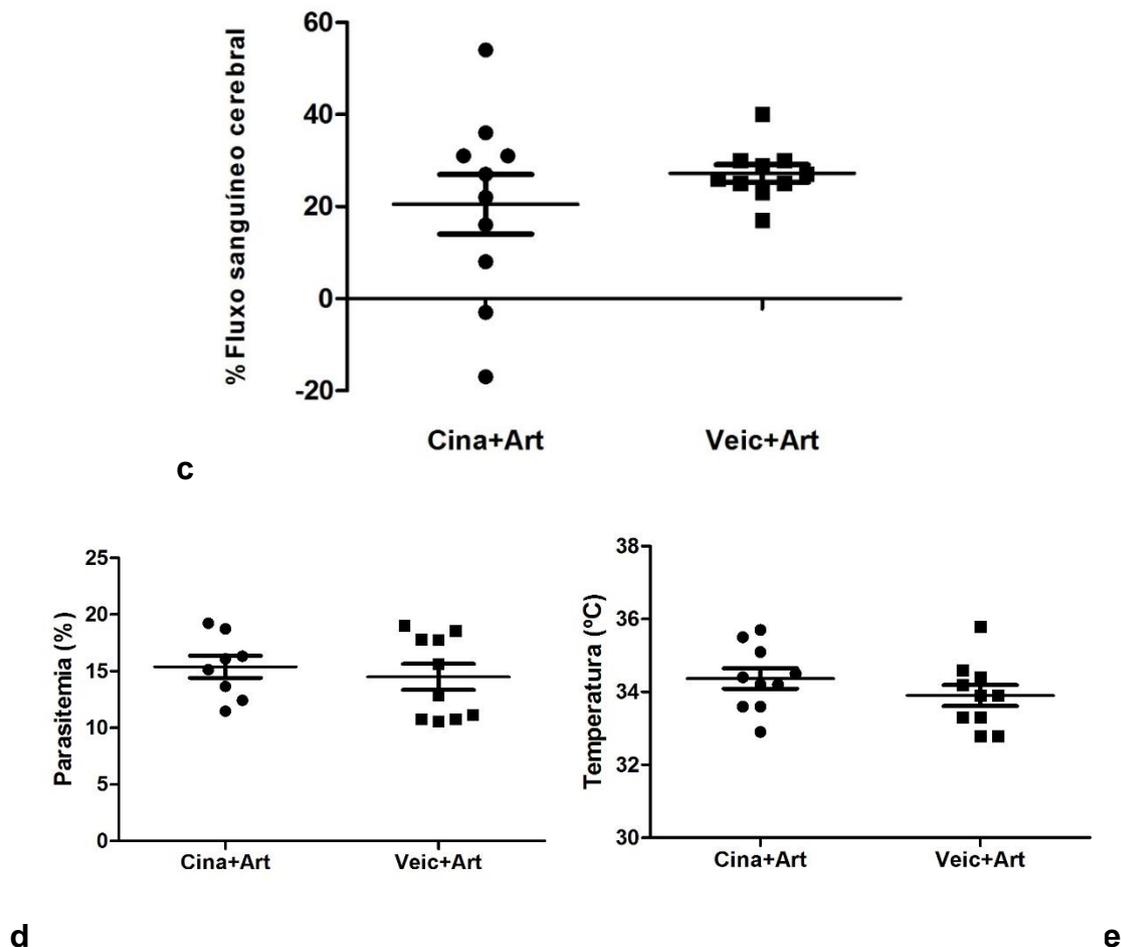
(a) Os animais com MCE tratados apenas com artemeter (n=6) também apresentaram aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora de sua administração (P valor = 0.0087; teste de Mann-Whitney). No lado esquerdo, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração antes e após o tratamento e, do lado direito, gráfico com as medidas de ambos os momentos de análise. (b) Temperatura do grupo com média próxima à 34 °C. (c) Parasitemia do grupo com média próxima a 10%.

#### 4.1.3 Fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com artemeter e cinaciguat

O estudo do efeito da droga ativadora de sGC cinaciguat (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sobre o fluxo sanguíneo cerebral foi feito da mesma forma do estudo com o riociguat. No primeiro experimento, animais com MCE foram anestesiados com uretano e tiveram o fluxo sanguíneo cerebral medido por 20 minutos (fluxo basal). Ao término da mensuração, os animais receberam o tratamento do cinaciguat (s.c.) e artemeter (i.p.). Após 1 hora do tratamento, os animais foram expostos novamente ao LSCI para mensuração. A figura 4.7a mostra que apesar de oito de 10 animais terem apresentado aumento do fluxo após 1 hora do tratamento, não foi observado aumento significativo nos valores da média do fluxo cerebral no grupo tratado com cinaciguat + artemeter (P valor = 0.0753). Como controle, um segundo grupo de animais recebeu apenas artemeter (i.p.) com veículo (s.c.) e também teve seu fluxo basal medido antes do tratamento e 1 hora depois. Todos os animais deste grupo apresentaram aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral (P valor = 0.0015) (figura 4.7b). Quando comparadas as porcentagens de aumento ou diminuição do fluxo entre os dois grupos, não foi observada diferença significativa (P valor = 0.3328) (figura 4.7c), indicando que o cinaciguat na dose de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  não

produziu efeito superior ao veículo sobre o fluxo sanguíneo cerebral 1 hora após a administração em camundongos com MCE.

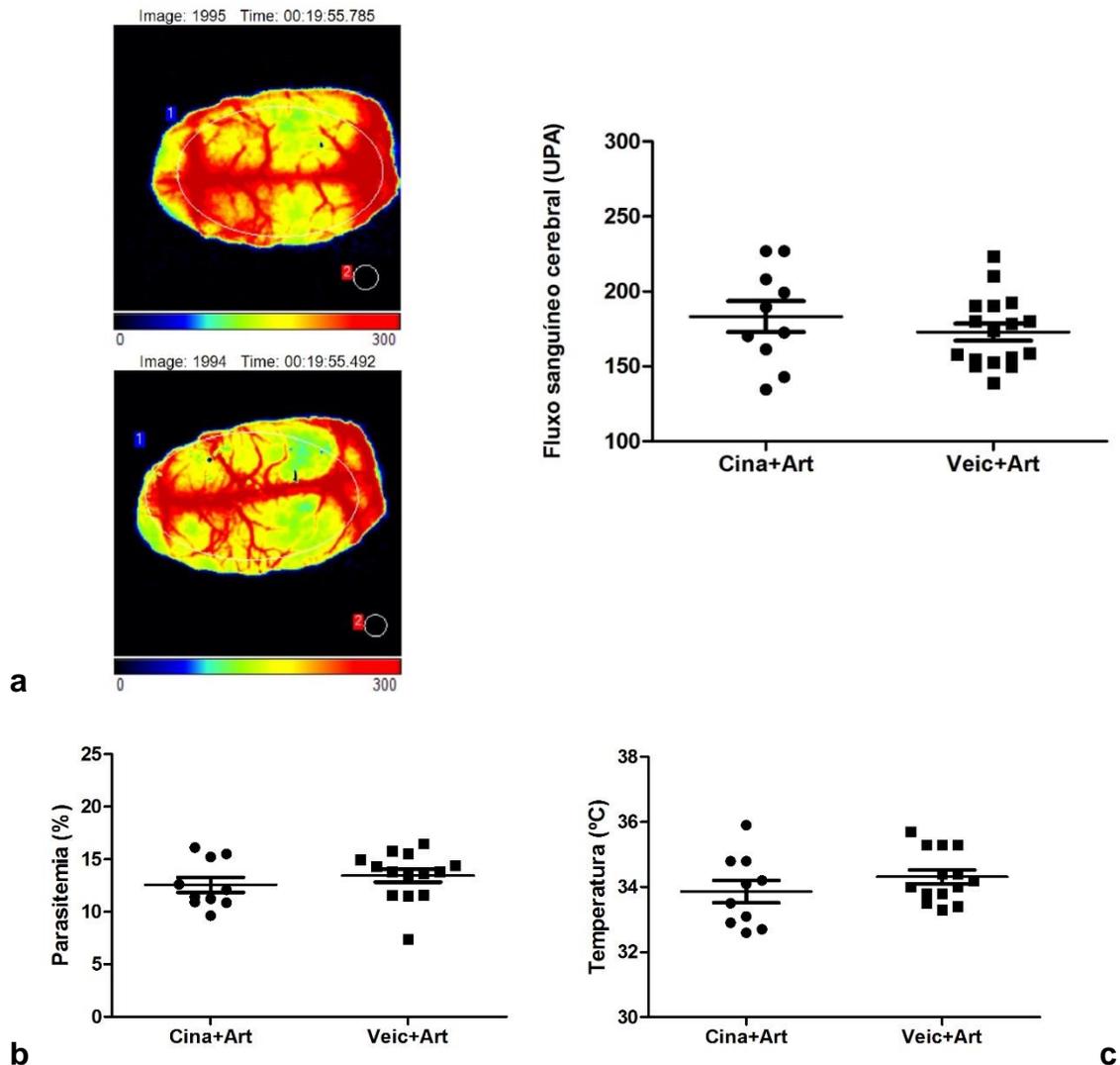




**Figura 4.7 - Fluxo sanguíneo cerebral 1 hora após o tratamento com cinaciguat**

(a) Primeiramente, o grupo teve seu fluxo sanguíneo mensurado por 20 minutos e ao término desse período recebeu o tratamento de cinaciguat + artemeter ( $n=10$ ). Uma hora após o tratamento, os animais foram expostos novamente ao LSCI para mensuração de 20 minutos. O fluxo sanguíneo cerebral aumentou na maioria dos animais, mas não houve diferença significativa no conjunto das medidas antes e após o tratamento ( $P$  valor = 0.0753, teste de Mann-Whitney). No lado esquerdo, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração antes e após o tratamento e, do lado direito, gráfico com as medidas de ambos os momentos de análise. (b) Assim como o grupo anterior, os animais tiveram seu fluxo sanguíneo cerebral medido e logo após receberam o tratamento de veículo + artemeter. Uma hora após o tratamento, tiveram seu fluxo mensurado novamente ( $n=10$ ). Houve aumento significativo do fluxo ( $P$  valor = 0.0015, teste de Mann-Whitney). No lado esquerdo, gráfico com as medidas de ambos os momentos de análise e, do lado direito, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração antes e após o tratamento. (c) Comparação da porcentagem de aumento ou diminuição dos valores obtidos do fluxo sanguíneo cerebral 1 hora após o tratamento entre os grupos tratados com cinaciguat + artemeter e veículo + artemeter. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $P$  valor = 0.3328, teste  $t$  não pareado). (d) Parasitemia de ambos os grupos com médias próximas a 15%, não havendo diferença significativa ( $P$  valor = 0.5742; teste  $t$  não pareado). (e) Temperatura dos dois grupos com média de 34 °C, não ocorrendo diferença significativa ( $P$  valor = 0.2582; teste  $t$  não pareado).

O experimento da análise do fluxo sanguíneo 6 horas após o tratamento mostrou que não houve diferença significativa no aumento do fluxo ( $P$  valor = 0.3458) (figura 4.8).



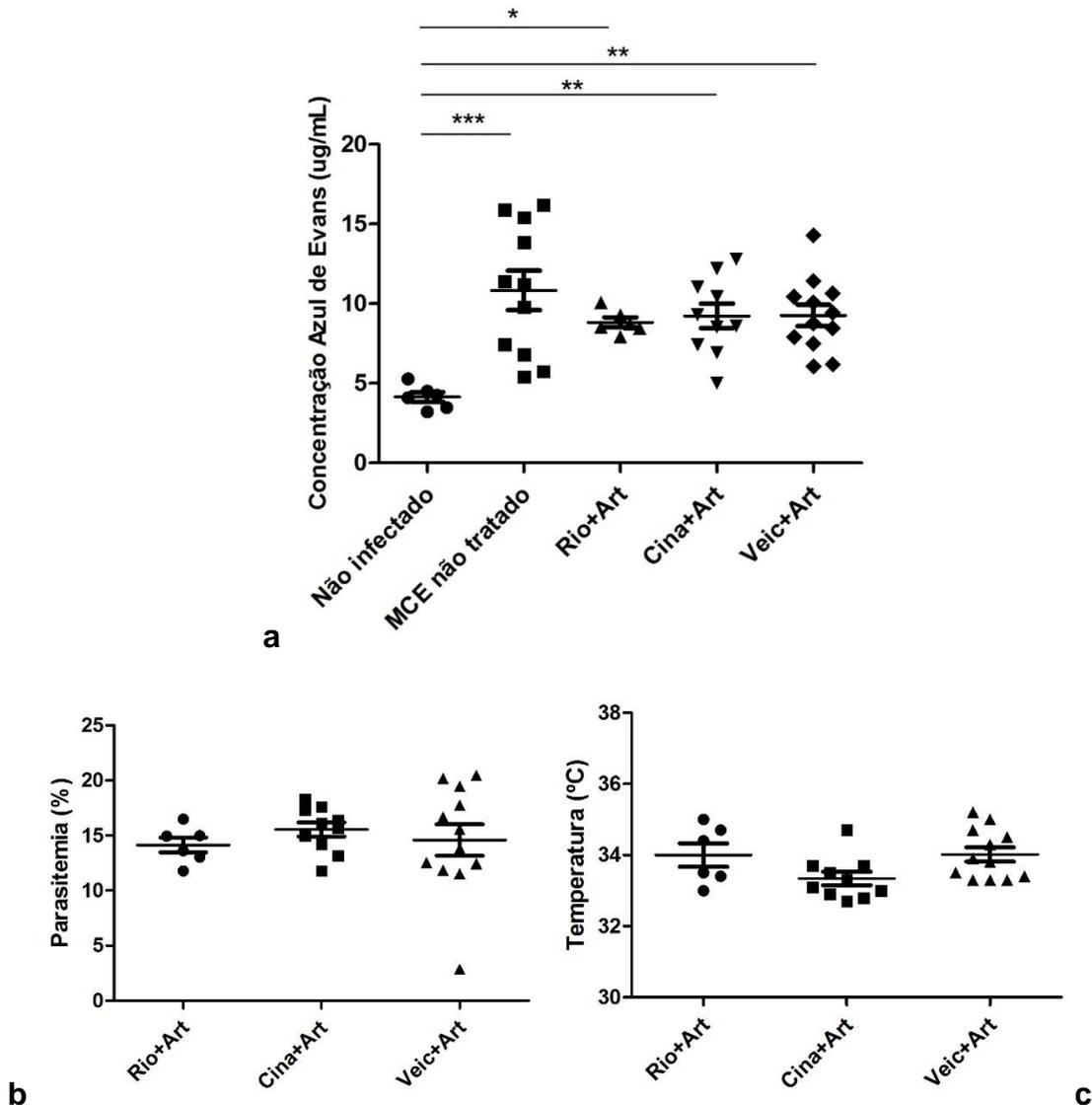
**Figura 4.8 - Fluxo sanguíneo cerebral após 6 horas de tratamento com cinaciguat e veículo**

(a) A comparação das medidas de fluxo sanguíneo cerebral obtidas após 6 horas de tratamento entre os grupos tratados com cinaciguat + artemeter (n=10) e veículo + artemeter (n=17) mostraram que não houve diferença significativa do aumento de fluxo entre os grupos (P valor = 0.3458, teste de Mann-Whitney). No lado esquerdo, imagem com padrão *speckle* representando a mensuração no tratamento com riociguat (acima) e veículo (abaixo) e, do lado direito, gráfico com as medidas de ambos os grupos. (b) Parasitemia dos dois grupos com média próxima a 13%, não ocorrendo diferença significativa (P valor = 0.3609; teste t não pareado). (c) Temperatura dos dois grupos com média próxima a 34 °C, não havendo diferença significativa (P valor = 0.2477; teste t não pareado).

## 4.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

No 6º dia de infecção, os animais com MCE foram tratados aleatoriamente com 3 mg/kg riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.) ou com 300 µg/kg cinaciguat (s.c.) + artemeter (i.p.) ou com veículo (s.c.) + artemeter (i.p.). Cinco

horas após o tratamento, os animais receberam o corante azul de Evans via intra ocular e, após uma hora, foram eutanasiados e seus cérebros removidos. Os animais não infectados-não tratados e os com MCE não tratados receberam os mesmos procedimentos que os demais para coloração e extração dos cérebros.



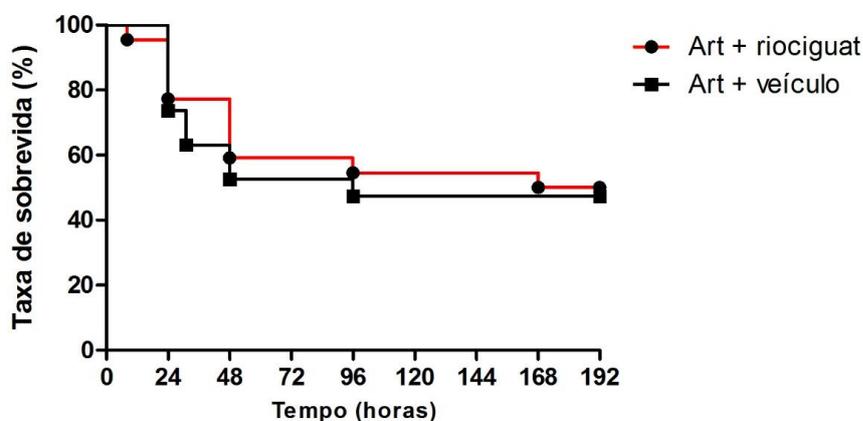
**Figura 4.9 - Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do corante azul de Evans no cérebro**

(a) O grupo controle não infectado ( $n=6$ ) apresentou concentração do corante significativamente menor do que os grupos com MCE não tratado ( $n=11$ ;  $P$  valor  $< 0.0005$ ), tratado com riociguat + artemeter ( $n=6$ ;  $P$  valor  $< 0.05$ ), tratado com cinaciguat + artemeter ( $n=10$ ;  $P$  valor  $< 0.005$ ) e tratado com veículo + artemeter ( $n=12$ ;  $P$  valor  $< 0.005$ ). Nenhum dos tratamentos diminuiu significativamente a permeabilidade quando comparados ao grupos dos animais com MCE não tratados ( $P$  valor  $> 0.05$ ; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey). (b) Parasitemia dos grupos com MCE tratados, com média próxima a 15%, não ocorrendo diferença significativa ( $P$  valor = 0.7124; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey). (c) Temperatura dos três grupos tratados com média próxima a 34 °C, não ocorrendo diferença significativa ( $P$  valor = 0.0651; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

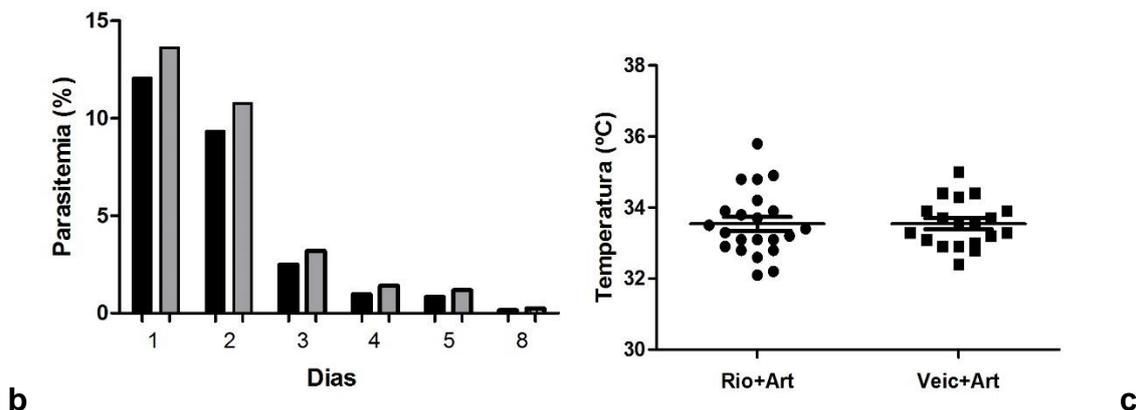
Pode-se observar na figura 4.9 um aumento significativo da concentração do corante no cérebro de animais com MCE, tratados ou não com artemeter + riociguat, artemeter + cinaciguat ou artemeter + veículo, quando comparados com animais controles não infectados. Esses dados mostram que animais com MCE apresentam quebra da barreira hematoencefálica, com aumento considerável da permeabilidade vascular cerebral ao azul de Evans. Não foram observadas diferenças na intensidade do aumento de permeabilidade vascular entre os diferentes grupos de animais com MCE, antes ou após os diferentes tratamentos.

### 4.3 Ensaio de sobrevida

Para analisar o efeito do tratamento adjuvante sobre a mortalidade, no dia 6 de infecção os animais com MCE passaram a receber aleatoriamente o tratamento de uma dose de 3 mg/kg riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.) ou de veículo (20% DMSO + 80% salina, s.c.) + artemeter (i.p.). O artemeter foi administrado durante cinco dias consecutivos, e o riociguat ou o veículo só foram dados nos dois primeiros dias. Os animais usados no ensaio se encontravam com temperatura na faixa aproximada de 32,5 °C a 36 °C. As parasitemias variaram de 8% a 20% no primeiro dia de tratamento. As taxas de mortalidade de ambos os grupos se mantiveram próximas ao longo da semana de tratamento, portanto, ao final de oito dias, a taxa de sobrevida dos dois grupos foi de aproximadamente 50% (figura 4.10).



a



#### Figura 4.10 - Ensaio de sobrevivida

(a) O ensaio de sobrevivida dos animais com MCE tratados com riociguat + artemeter (n=22, linha vermelha) e veículo + artemeter (n=19, linha preta) mostrou que não houve diferença significativa, com taxa de sobrevivida de 50% no grupo riociguat e 47% no grupo veículo (P valor = 0.7836, teste de Log-rank - Mantel-Cox). (b) Parasitemia (%) do grupo riociguat + artemeter (preto) e veículo + artemeter (cinza) ao longo de quatro dias de tratamento e no primeiro dia da bateria de testes de comportamento (oitavo dia). O dia 1 refere-se a parasitemia antes do início do tratamento e os dias 2, 3, 4 e 5 os que receberam tratamento. Não houve diferença significativa entre as parasitemias de ambos os grupos ao longo dos dias (P valor >0.05; two-way ANOVA). (c) Temperatura dos animais dos dois grupos tratados logo antes do momento do tratamento, não havendo diferença significativa (P valor = 0.9963; teste t não pareado).

## 4.4 Testes de comportamento

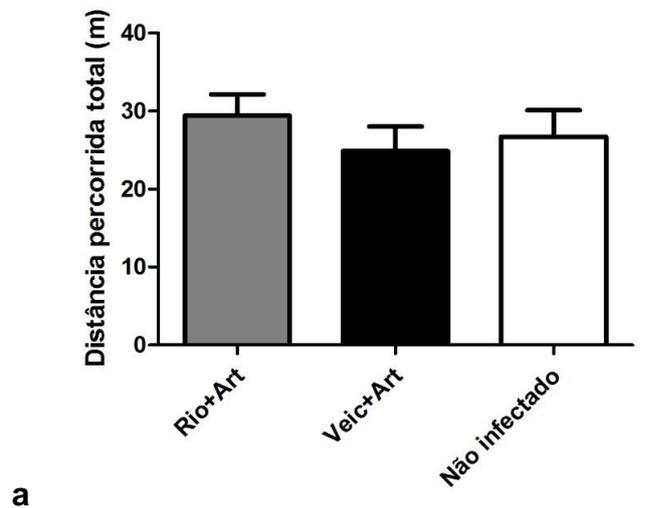
### 4.4.1 Campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado no 3º e 4º dias após o término do tratamento quando a parasitemia já estava zerada, com o intuito de comparar a locomotividade, a ansiedade e a memória de habituação entre os animais controles não infectados e os animais tratados sobreviventes da MCE do ensaio descrito acima. As duas sessões do teste se deram de forma idêntica, com duração de 10 minutos cada.

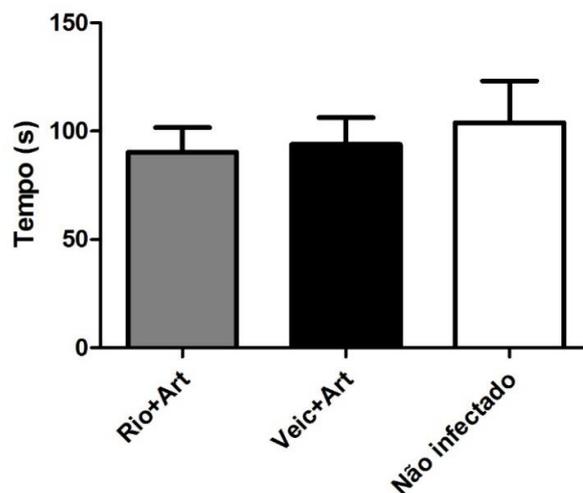
A locomotividade foi analisada por meio do teste de campo aberto 1 (primeira sessão), já que no teste de campo aberto 2 (segunda sessão, 24 horas após a primeira) os animais naturalmente tendem a andar menos. Não houve diferença significativa entre as distâncias percorridas dos animais controles não infectados e dos infectados tratados, indicando que a locomotividade não foi alterada pela doença (figura 4.11a).

A ansiedade dos animais foi analisada por meio da contagem de tempo que o animal ficava na região do centro do aparato do teste de campo aberto 1. Também não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando que os animais que tiveram MCE e foram tratados não apresentaram níveis de ansiedade diferente dos controles (figura 4.11b).

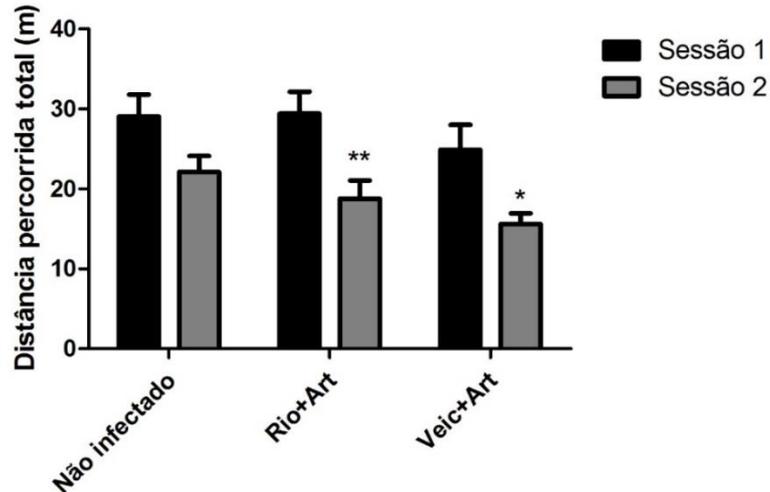
Na análise de memória de habituação, foi comparada a primeira sessão (treino) com a segunda sessão (teste) (realizada 24 horas após a primeira). Nos grupos de animais que tiveram MCE e foram tratados, a arena foi significativamente menos explorada na segunda sessão, mostrando aquisição de memória de habituação de longo prazo. Quando comparadas apenas as segundas sessões entre os grupos, não há diferença significativa (figura 4.11c).



a



b



**c**

**Figura 4.11 – Avaliação da locomotividade, ansiedade e memória de habituação**

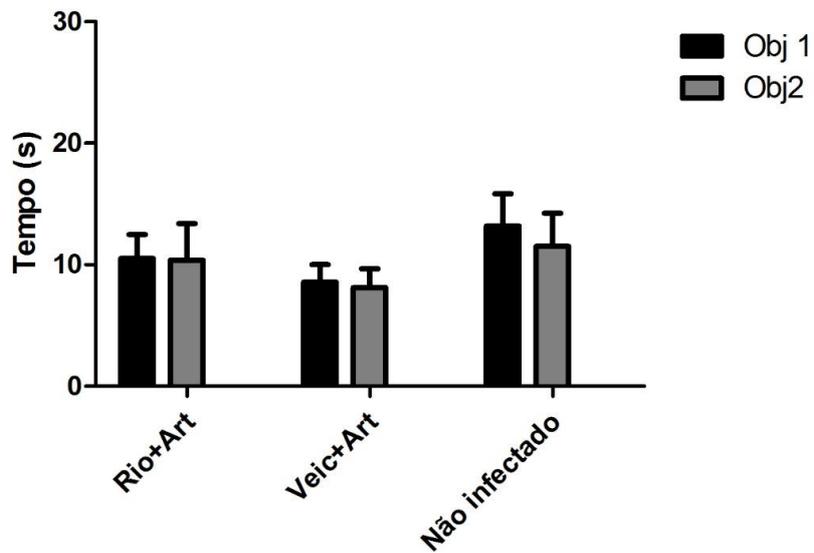
(a) A distância percorrida (m) na arena da primeira sessão do campo aberto foi utilizada para avaliar a locomotividade. Não houve diferença significativa na locomotividade entre os animais não infectados (n=10) e infectados tratados com riociguat (n=10) ou veículo (n=9) (P valor > 0.05; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey). (b) O tempo (s) em que o animal permaneceu na área central da arena durante a primeira sessão do campo aberto foi utilizado para avaliar a ansiedade. Não houve diferença significativa no tempo de permanência no centro entre os animais não infectados e infectados tratados (P valor > 0.05; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey). (c) No teste para avaliar memória de habituação (ou memória de longo prazo), comparou-se a distância percorrida entre a primeira sessão (preto) e a segunda (cinza), obtendo-se diferença significativa nos grupos infectados tratados com riociguat (P valor < 0.01) e veículo (P valor < 0.05), enquanto que o grupo controle não infectado não mostrou diferença significativa (P valor > 0.05; two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). Comparando apenas a distância percorrida na segunda sessão do campo aberto entre os três grupos, não houve diferença significativa de exploração (P valor > 0.05; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

**4.4.2 Reconhecimento de objetos**

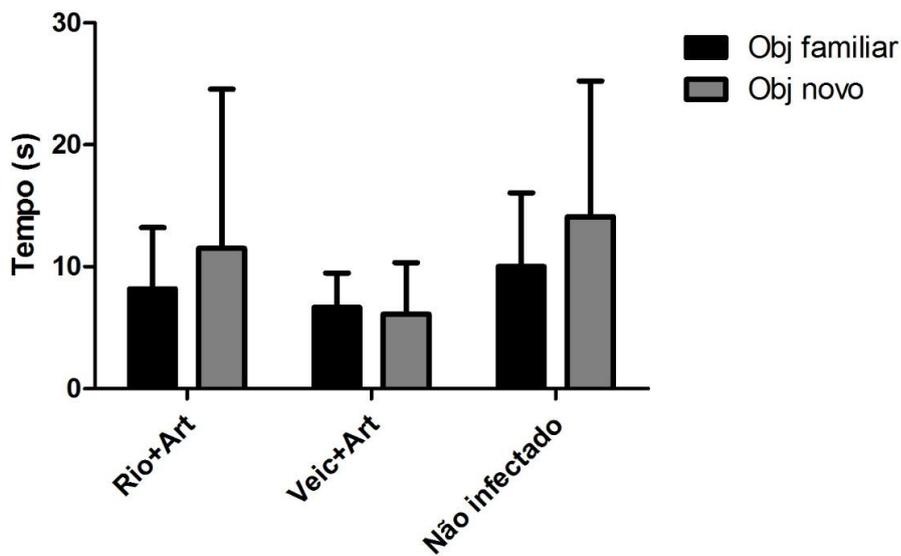
O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no 5º e 6º dias após o término do tratamento, tendo o objetivo de avaliar o aprendizado, isto é, a memória de longo prazo. Na sessão treino, ocorrida no primeiro dia, os dois objetos eram idênticos e foram posicionados com distâncias similares ao aparato. Não houve diferença significativa da exploração do objeto 1 e 2 em cada grupo, indicando que o teste foi válido pois ambos os objetos foram explorados igualmente (figura 4.12a).

Na sessão teste, realizada no segundo dia, um dos objetos foi trocado por outro de tamanho e textura diferentes, ficando posicionado exatamente no mesmo local que o objeto anterior se encontrava. Os grupos controle e tratados

com riociguat + artemeter exploraram mais o objeto novo do que o familiar, apesar da diferença de exploração dos objetos não ter sido significativa. Já o grupo tratado com veículo + artemeter explorou de maneira similar novamente ambos os objetos, mostrando que este grupo ficou com o aprendizado afetado. Quando comparado apenas o tempo de exploração do objeto novo, há diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com veículo + artemeter, realçando que este grupo teve dano no aprendizado e o tratamento não ajudou a recuperar o dano (figura 4.12b).



a



b

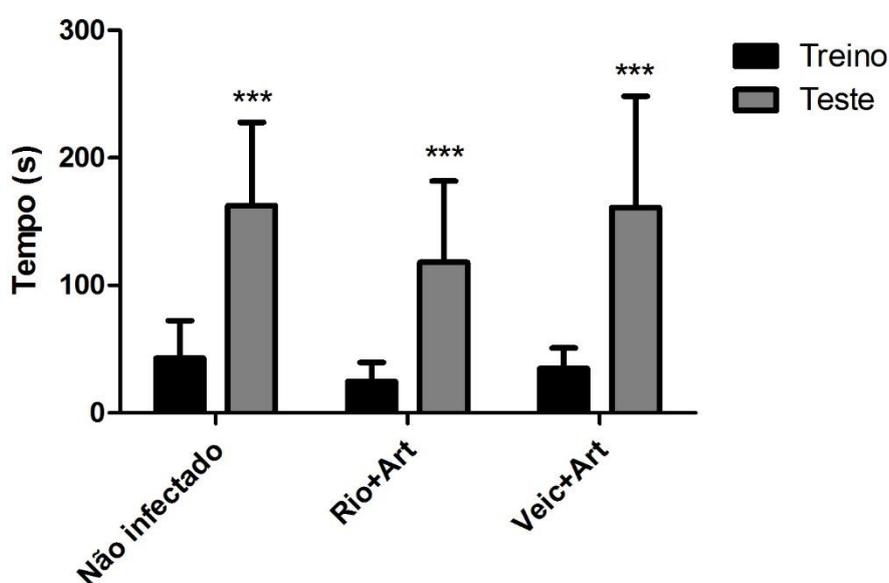
#### Figura 4.12 – Tempo de exploração no teste de reconhecimento de objetos

(a) Na sessão treino, os três grupos avaliados exploraram similarmente o objeto 1 (preto) e o objeto 2 (cinza), não havendo diferença significativa ( $P$  valor  $> 0.05$ ; two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). (b) Na sessão teste, não houve diferença significativa na exploração do objeto familiar (preto) e objeto novo (cinza) em todos os grupos (animais não infectados [ $n=10$ ], tratados com riociguat [ $n=10$ ] e tratados com veículo [ $n=9$ ];  $P$  valor  $> 0.05$ ; two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). Não houve diferença significativa na exploração dos objetos novos entre os três grupos ( $P$  valor  $> 0.05$ ; one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey).

#### 4.4.3 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado no 7º dia após término do tratamento, com o intuito de analisar a aquisição de memória de curto prazo. Na primeira sessão do teste, assim que o animal descia à grade, ele levava um choque de 0,5 mA durante 3 segundos. A segunda sessão ocorreu 3,5 horas após a primeira, onde apenas se avaliava o tempo que o animal descia à grade, sem necessidade de ativar o choque novamente.

Foi observado que todos os animais apresentaram bom desempenho de memória de curta duração, uma vez que houve diferença significativa entre o tempo de descida da primeira e da segunda sessão. Entretanto, quando analisado o tempo de descida apenas da segunda sessão entre os grupos, não houve diferença significativa, mostrando que a memória de curto prazo não foi danificada nos animais que tiveram MCE ou que o antimalárico por si só já teve um efeito benéfico na restauração dessa memória (figura 4.13).



**Figura 4.13 - Tempo de descida à grade no teste de esquiva inibitória**

Na primeira sessão (preto) foi cronometrado quanto tempo o animal levava para descer à grade e, ao fazê-lo, receber um choque de 0,5 mA por 3 segundos. Na segunda sessão (cinza), realizada 3,5 horas após a primeira, foi apenas cronometrado o tempo de descida do animal à grade, sem necessidade de outro choque. O grupo controle (n=10), o grupo dos tratados com riociguat (s.c.) + artemeter (i.p.) (n=9) e o grupo tratado com veículo (s.c.) + artemeter (i.p.) (n=9) mostraram bom desempenho no teste, demorando significativamente para descer à grade na segunda sessão (P valor < 0.0001; two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). Não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de descida da segunda sessão (one-way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey). O teste foi interrompido com cinco minutos, no caso dos animais que não desceram à grade.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados da fluxometria com o LSCI dos animais com MCE mostraram redução significativa do fluxo sanguíneo cerebral em comparação com os animais controles. Esse dado corrobora estudos anteriores de nosso próprio grupo (Moreira A., 2015), assim como estudos com outras metodologias, como o de Penet et al. [117], que utilizou ressonância magnética *in vivo* nesse mesmo modelo de MCE, revelando redução da perfusão cerebral e formação de edema, com grande disfunção hemodinâmica, acompanhados de níveis elevados de lactato e fosfatos de alta energia reduzidos, indicando um perfil metabólico isquêmico. O edema agrava a isquemia por meio da compressão das artérias cerebrais levando, conseqüentemente, ao colapso do fluxo sanguíneo, sugerindo que seja o fator causal mais evidente da morte dos animais com MCE. Um estudo de nosso grupo [74] também confirmou a diminuição do fluxo sanguíneo durante a MCE por meio de microscopia intravital do cérebro. Foi observado que o sequestro de leucócitos diminui a perfusão cerebral, estreitando o diâmetro luminal dos vasos e bloqueando vênulas pós-capilares. Um dado crítico foi a observação de vasoconstrição com diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e conseqüente queda do fluxo sanguíneo arterial da pia-máter. O tratamento dos animais com antimalárico associado com nimodipina, um bloqueador de canais de cálcio que provoca vasodilatação, resultou em aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral, e também aumentando a sobrevivência substancialmente. Esses dados novamente afirmam que a redução do fluxo sanguíneo cerebral é um evento crítico que leva o indivíduo à morte, uma vez que a administração de fármacos que revertem a vasoconstrição diminui a mortalidade dos animais.

A redução do fluxo sanguíneo com hipóxia cerebral também é uma das características principais na MC humana. O bloqueio ou diminuição do lúmen dos vasos por acúmulo de eritrócitos parasitados e não parasitados, acúmulo de plaquetas e leucócitos, o dano vascular, a disfunção endotelial levando à vasoconstrição, microhemorragias e redução da perfusão tecidual são algumas das características que explicam a queda do fluxo sanguíneo cerebral [19,22]. As áreas afetadas no cérebro com restrição ou bloqueio do fluxo microvascular

tem diminuído também os níveis de O<sub>2</sub> necessários para o metabolismo celular, o que levará o indivíduo ao óbito.

Por esse motivo, postulamos que intervenções que atuem na reversão da vasoconstrição cerebral levariam a um aumento da perfusão sanguínea cerebral, revertendo o processo isquêmico e dando maiores chances de sobrevivência aos indivíduos afetados. Uma vez que os eventos vasoconstritores na MCE são o resultado da disfunção vascular envolvendo uma deficiência de NO e, conseqüentemente, de sua sinalização, nos propusemos a avaliar o efeito de estimuladores (riociguat) e ativadores (cinaciguat) da sGC nesse contexto.

Nos experimentos de avaliação do fluxo sanguíneo cerebral com o riociguat, foi observado aumento significativo do fluxo, em torno de 20%, 1 hora após o tratamento. Entretanto, o aumento observado após a administração de riociguat (+ artemeter) foi semelhante ao induzido pelo veículo (+ artemeter), indicando que o efeito observado não foi devido à droga teste. Consideramos inicialmente que poderia haver um efeito benéfico do volume de líquido administrado (100 µL) sobre a circulação sanguínea, uma vez que a hipovolemia tem sido demonstrada na malária grave humana [15,118], o que leva à hipoperfusão de órgãos vitais. Essa constatação, inclusive, foi o fundamento utilizado para propor a reposição de líquidos como potencial terapia adjuvante para malária grave, embora testes clínicos tenham revelado que a reposição de líquidos tinha efeito deletério na sobrevivência desses pacientes [119]. De fato, 100 µL do veículo injetado equivalem a cerca de 10 a 20% do volume de plasma de um camundongo, o que certamente poderia ter algum impacto. Por esse motivo, incluímos um grupo controle adicional de animais com MCE tratados apenas com artemeter, em pequeno volume (20 µL) de formulação oleosa, sem a injeção concomitante de qualquer volume aquoso, e verificamos que isso também resultou em um aumento significativo de fluxo sanguíneo após uma hora. Esse dado indica que o artemeter, por si só, apresenta um efeito imediato benéfico sobre o fluxo sanguíneo cerebral. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o artemeter não é capaz, por si só, de reverter a vasoconstrição cerebral na MCE, mas diminuiu drasticamente a adesão celular nos vasos cerebrais em 24 horas,

desobstruindo os vasos e permitindo assim melhor fluxo sanguíneo [102]. Entretanto, o efeito rápido do artemeter aqui demonstrado, apenas 1 hora após a administração, é curioso e inesperado e requer maiores investigações. Alguns estudos já relataram que o artemeter possui efeito anti-inflamatório, suprimindo mediadores pró-inflamatórios, como NO/iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$ , prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaglandina E sintase-1 microsomal, ciclooxigenase-2 e aumentando a IL-13, que está associada com proteção e redução da gravidade da MC, podendo explicar o aumento do fluxo sanguíneo [120,121].

Apesar de o riociguat + artemeter não ter apresentado um efeito diferente daquele observado com a administração do artemeter ou veículo + artemeter sobre o fluxo sanguíneo cerebral no espaço de uma hora, com um intervalo de 6 horas após a administração pode-se observar um efeito nítido dessa droga. Animais com MCE tratados com riociguat + artemeter apresentaram um fluxo sanguíneo cerebral cerca de 20% maior que animais tratados com veículo + artemeter. Esses dados indicam que a administração de artemeter, por si só, causa um aumento de fluxo sanguíneo cerebral de curta duração, ao passo que a sua combinação com o riociguat proporciona um efeito sustentado. Assim sendo, esses dados indicam que nossa hipótese de trabalho, nesse caso, estava correta. A estimulação de sGC aumenta os níveis de GMPc, gerando diversas fosforilações e causando relaxamento muscular dos vasos sanguíneos, aumentando a passagem de fluxo naquela região [91]. É importante ressaltar que, no nosso conhecimento, essa é a primeira demonstração de efeito benéfico de riociguat sobre o fluxo sanguíneo cerebral. Até o momento, o riociguat tem sido extensivamente estudado como terapêutica para hipertensão pulmonar arterial (PAH), tendo inclusive sido o primeiro estimulador de sGC a ir para a fase clínica de desenvolvimento para essa doença. Os testes clínicos mostraram que ele aumenta significativamente a hemodinâmica vascular pulmonar e a habilidade de exercício nos pacientes com PAH e hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (CTEPH), além de diminuir a resistência vascular pulmonar em pacientes com PAH associada com disfunção sistólica do ventrículo esquerdo [122]. Em estudo com ratos com PAH grave, induzidos por hipóxia e SU5416 (receptor antagonista de fator de crescimento endotelial vascular), o riociguat diminuiu significativamente a

pressão sistólica ventricular direita e a resistência pulmonar total, aumentou o débito cardíaco e também diminuiu significativamente o número de artérias ocluídas [98]. O ótimo efeito demonstrado na hemodinâmica pulmonar mostra que esta droga gera vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, além de outros benefícios.

Mais estudos demonstraram que o riociguat pode atuar em outras redes vasculares além da pulmonar, embora, como mencionado, esta seja a primeira demonstração desse efeito na circulação sanguínea cerebral. Além disso, esta é, no nosso conhecimento, a primeira aplicação de um estimulador de sGC sobre complicações vasculares em uma doença aguda de caráter infeccioso, uma vez que o desenvolvimento e aplicação de tais compostos têm como alvo tradicional doenças vasculares crônicas como a PAH e a hipertensão arterial. O riociguat possui de fato efeito sinérgico anti-hipertensivo quando administrado juntamente com um bloqueador de receptor de angiotensina II em camundongos que não expressam a eNOS [104]. No estudo de Sharkovska et al. [100], o riociguat normalizou a pressão sanguínea em coelhos nitrato-tolerantes, reduziu o dano no órgão cardíaco por meio da redução da fibrose intersticial cardíaca, reduziu o dano no órgão renal por meio da diminuição de glomerulosclerose e fibrose intersticial renal em ratos hipertensivos renina-trangênicos tratados com L-NAME. No trabalho de Geschka e colaboradores [103], esta droga atenuou a hipertensão sistêmica e a disfunção sistólica, diminuiu o remodelamento do tecido fibrótico no miocárdio e córtex renal e aumentou a sobrevida em modelo de hipertensão com ratos. Ambos os estudos mostraram que o riociguat possui efeito protetor em modelos de hipertensão sistêmica, além de aumentar a sobrevida.

Camundongos com MCE apresentam queda de pressão arterial [85]. Assim sendo, a utilização de vasodilatadores sistêmicos como os estimuladores e ativadores de sGC requer cuidados e poderia ser considerada, a princípio, contra intuitivo nessas circunstâncias. Entretanto, estudos anteriores de nosso grupo mostraram que a administração de vasodilatadores como nitroglicerina [89], GSNO [88], ou nimodipina [84] têm efeitos vasodilatadores cerebrais e/ou na sobrevida sem apresentarem agravamento da hipotensão nesses animais. Um estudo do efeito de riociguat sobre a

pressão arterial em animais com MCE é necessário e, de fato, estava previsto para esta dissertação, mas não pode ser conduzido devido a problemas com o equipamento em nosso laboratório.

Diferentemente dos estudos citados anteriormente, neste trabalho aqui apresentado o tratamento adjuvante com riociguat não resultou em aumento de sobrevida de animais com MCE quando comparado ao tratamento com veículo. Apesar do aumento de fluxo sanguíneo cerebral sustentado nas primeiras horas do tratamento, parece que isso não é suficiente para diminuir a mortalidade dos animais. Em estudos anteriores, foi observado que a reversão da vasoconstrição cerebral pela nitroglicerina estava relacionada ao aumento de sobrevida em animais com MCE [89]. Naquele caso, entretanto, a nitroglicerina foi administrada na forma de adesivos de liberação transdérmica lenta e continuada por 24 horas, o que permitiu manter níveis plasmáticos elevados durante todo esse período. No presente estudo, o riociguat foi administrado em bolus subcutâneo, duas vezes em um intervalo de 24 horas, e é possível que o efeito benéfico sobre a circulação cerebral não tenha sido tão prolongado. Há a necessidade de se avaliar esse efeito para além das seis horas, como realizado nesse estudo. Assim, a ausência de efeito protetor na sobrevida talvez possa ser explicada pelos esquemas e doses testados. Nos estudos de Geschka [103] e Sharkovska [100] a sobrevida foi substancialmente aumentada com a mesma dose (3 mg/kg), porém, em se tratando de agravos crônicos de hipertensão, os animais foram tratados com esta droga por gavagem por 14 e 18 dias consecutivos, respectivamente. De qualquer maneira, o efeito de recuperação ou aumento do fluxo sanguíneo cerebral, de forma sustentada (6 horas), como observado no presente estudo, é promissor e, por preservar o tecido cerebral de um insulto isquêmico mais severo e prolongado, gera a expectativa de que a otimização de doses e esquemas de tratamento possa levar a um aumento da sobrevida dos indivíduos com MC.

Nos experimentos de avaliação do fluxo sanguíneo cerebral em animais tratados com o ativador de sGC cinaciguat, em nenhum dos dois tempos pós-tratamento ocorreu aumento significativo em comparação com os animais tratados com veículo. Existia uma expectativa na utilização de tal composto pelo fato de que o forte estresse oxidativo presente na MCE poderia causar a

transformação do NO em peroxinitrito. Esses eventos oxidativos fazem com que a sGC perca seu grupamento heme, não respondendo mais ao NO. Porém, na presença do cinaciguat, a enzima funcionaria normalmente, como se tivesse sido ativada pelo próprio NO [123]. Esse resultado foi inesperado, uma vez que em diversos estudos esta droga se mostrou um potente vasodilatador em situações de estresse oxidativo. No modelo ovino de PAH, o cinaciguat produziu vasodilatação pulmonar, aumentou a oxigenação arterial sistêmica e aumentou a liberação de cGMP transpulmonar, sem efeito significativo na pressão arterial média [124]. Em um trabalho utilizando um modelo de lesão com reperfusão-isquêmica cardíaca em cachorros que sofreram parada cardioplégica e circulação extracorpórea, o pré-condicionamento com cinaciguat aumentou a contratilidade do ventrículo esquerdo e direito, aumentou o fluxo sanguíneo coronário e aumentou a vasodilatação endotélio-dependente [125]. Em outro modelo de isquemia/reperfusão no coração, o tratamento com esse composto reduziu significativamente o tamanho do infarto e reperfusão, tanto em coelhos como em camundongos, e ainda aumentou a atividade da PKG miocárdica [96]. Em modelos de doenças renais, foi observado que o tratamento com o cinaciguat reduziu a pressão sanguínea e a hipertrofia ventricular esquerda e desacelerou a progressão de doença renal em ratos com nefrectomia [95], além de ter estabilizado parcialmente a hipertensão e vasoconstrição renal e ter restabelecido a modulação da autoregulação do fluxo sanguíneo renal [126].

Novamente, no caso do cinaciguat, pode-se especular que a ausência de aumento significativo no fluxo sanguíneo cerebral no presente estudo seja devida à dose e/ou esquema de tratamento. A dose utilizada foi baseada no estudo de Thoonen et al. [94], que foi suficiente para os efeitos da sGC se manifestarem normalmente em animais que apresentavam somente a forma da sGC oxidada. No estudo de Thoonen a resposta a esta dose pode ter sido muito efetiva pois os animais apresentavam somente a sGC livre de heme, tornando-se um ambiente altamente propício para a ligação do cinaciguat em qualquer sGC. Stasch et al. [123] perceberam que a variação da abundância de sGC oxidada altera marcadamente a resposta aos ativadores de sGC. Ou seja, pode ser que na MCE a dose administrada neste trabalho não tenha sido

suficiente para atingir a quantidade de sGC oxidada presente nos animais infectados e ativá-la. Também podemos considerar que talvez na MCE a sGC em seu estado reduzido seja mais abundante do que a sua forma oxidada, podendo explicar o porquê do estimulador ter obtido melhor resposta do que o ativador. É válido igualmente considerar que nenhum estudo analisou o tecido cerebral após o tratamento com esta droga, logo, pode ser que o cinaciguat não tenha chegado suficientemente ao cérebro quando administrado na dose de 300 µg/kg por meio da via s.c.

Nos experimentos de permeabilidade da barreira hematoencefálica houve, como esperado, aumento significativo nas concentrações de azul de Evans no cérebro dos animais com MCE (não tratados) quando comparados aos animais não infectados. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais tratados com artemeter em todas as combinações (riociguat, cinaciguat ou veículo) depois de 6 horas em relação aos infectados não tratados, nos esquemas de tratamentos e doses testadas. A barreira hematoencefálica é formada por pericitos, terminações de astrócitos, endotélio microvascular e membrana basal [30]. As células endoteliais dos capilares cerebrais possuem eNOS, enquanto a iNOS está presente nos astrócitos, ambas participando da via NO-sGC-cGMP [127]. Em um trabalho que objetivava analisar o efeito do NO no dano à barreira hematoencefálica gerado durante a hipóxia/reoxigenação (H/R), foi observado que, ao usar um doador de NO, a permeabilidade da barreira induzida pela H/R foi atenuada. Os resultados desse estudo mostraram que o NO pode sequestrar efetivamente as ROS formadas durante a H/R nas células endoteliais cerebrais, fornecendo proteção à barreira hematoencefálica tanto em relação ao aspecto funcional como molecular [128]. Ou seja, nesse caso o efeito benéfico do NO sobre a permeabilidade vascular se deu por mecanismo independente de sinalização por sGC. Se esse for o caso, a administração de riociguat ou cinaciguat não afetaria a permeabilidade vascular e, assim sendo, não substituiria o potencial benéfico de doadores de NO. Entretanto, o estudo de Wong et al. [129] com modelo de barreira hematoencefálica humana in vitro contendo células endoteliais que possuíam eNOS mas com pouca produção de NO, mostrou que a administração de doadores de NO ou agonista da cGMP aumentavam a

resistência da monocamada endotelial. Quando a sGC foi inibida com ODQ ou a proteína quinase dependente de cGMP foi inibida, a resistência da monocamada rapidamente diminuiu. Também foi observado que IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e LPS aumentavam a permeabilidade da barreira por meio da diminuição da resistência elétrica transendotelial e que tanto os doadores de NO como o agonista da cGMP revertiam esse efeito. Logo, o estudo mostrou que o NO pode diminuir a permeabilidade da barreira hematoencefálica humana por meio de um mecanismo dependente da produção de cGMP resultante da ativação da sGC. Obviamente, a tentativa de reversão de um processo extremamente danoso ao endotélio cerebral *in vivo*, como é o caso da MCE, através de intervenções farmacológicas, apresenta uma vasta gama de complicadores não observados em estudos mecanísticos *in vitro*, como os mencionados acima.

Os testes que analisam a cognição dos animais foram realizados no intuito de verificar se os tratamentos surtiram algum efeito sob este aspecto. Nos experimentos de campo aberto, animais controles e os tratados com riociguat ou veículo não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros de locomotividade e ansiedade. A locomotividade realmente não parece ser afetada em animais curados da MCE. Desruisseaux et al. [76] observaram em 11 dias de infecção com PbA que os animais não apresentaram piora na locomotividade com o mesmo teste de campo aberto. Dai et al. [130] e Guha et al. [131] também não observaram diferença na locomotividade e exploração após *clearance* parasitário. Campos et al. [80] observaram que no 5º dia de infecção com PbA os animais apresentavam significativa diferença na distância percorrida quando comparados aos animais não infectados, mas isso é esperado, uma vez que nesse caso os animais estavam doentes, não tratados. De fato, a infecção por PbA, na medida em que a doença evolui, afeta cada vez mais o desempenho dos animais em testes comportamentais e motores, como já demonstrado em outros estudos, inclusive de nosso próprio grupo [73,74]. O estudo de Campos e colaboradores também avaliou a ansiedade, mostrando que no 5º dia de infecção os animais se comportaram de maneira ansiosa, percorrendo menor distância no centro do campo aberto do que os animais controles. No 18º dia pós-infecção, o grupo tratado com artesunato e livre de plasmódios demonstrou comportamento ansioso no teste de labirinto em cruz

elevada, enquanto que o tratamento com artesunato + cannabidiol preveniu o comportamento ansioso. Nossos resultados diferem deste achado, uma vez que tanto os animais tratados com artemeter + veículo como aqueles tratados com artemeter + riociguat apresentaram o desempenho nos testes de comportamento semelhantes aos animais controles não infectados, sugerindo que animais que se recuperam da MCE não são afetados no aspecto da ansiedade.

Tanto o teste do campo aberto quanto o do reconhecimento de objetos foram utilizados para analisar a memória de longo prazo, enquanto que o teste de esquiva inibitória objetivou analisar a memória de curto prazo. A memória de curto prazo se dá por modificações na transmissão sináptica, gerando sinais intracelulares por meio de segundos mensageiros, enquanto a de longo prazo é formada através da modificação de proteínas sinápticas preexistentes [132]. No teste de campo aberto, todos os animais tratados exploraram significativamente menos a arena no segundo dia, mostrando que adquiriram memória de habituação e não houve diferença na distância percorrida entre os grupos tratados e não infectados. No teste de reconhecimento de objetos todos os animais exploraram similarmente todos os objetos das duas sessões, ou seja, os animais que tiveram MCE se comportaram de maneira similar aos animais controles não infectados, não mostrando aquisição de memória de longo prazo. No experimento de esquiva inibitória, todos os grupos demoraram significativamente a descer à grade na segunda sessão do teste, mostrando ganho de memória de curto prazo, mas não ocorrendo diferença significativa entre os tempos de descida, o que mostra que os animais que tiveram MCE não tiveram sua memória afetada.

Os achados de nosso estudo, no que se refere a esses testes comportamentais e de memória, são intrigantes pois nosso desenho experimental induz uma malária de gravidade bem mais intensa do que aqueles utilizados nos estudos citados acima. Em nosso estudo, os animais só são tratados (com artemeter e droga adjuvante ou veículo) com malária cerebral estabelecida, ou seja, depois que desenvolvem sinais clínicos dessa complicação. O critério objetivo para tratamento é a presença de hipotermia, com temperatura retal entre 32,5 °C e 36 °C. Animais nesse estágio vão a óbito

em poucas horas se não tratados e, na maioria dos casos, isso ocorre mesmo quando são tratados com derivados de artemisinina [73,74,133]. Nos estudos citados, os animais em sua maioria foram tratados antes do estabelecimento completo da síndrome neurológica [78-80]. Ou seja, era de se esperar que os animais em nosso estudo apresentassem sequelas neurológicas, como dano cognitivo, em grau mais intenso ou pelo menos em grau semelhante às aquelas evidenciadas nos estudos citados.

O estudo de Desruisseaux e colaboradores [76] observou que animais com MCE apresentam dano significativo na memória visual por meio do teste de reconhecimento de objetos voltado para memória de trabalho, pois no 7º dia de infecção os animais exploraram significativamente menos o objeto novo quando comparados aos controles não infectados. Porém, quando o teste foi realizado sob os parâmetros de exploração dos objetos, também não ocorreu diferença significativa entre os dois grupos, sendo este resultado similar ao encontrado no presente trabalho. Por meio de análise histológica, a disfunção cognitiva foi relacionada a hemorragias, inflamação, mudanças na atividade e morfologia microglial detectadas nos cérebros dos camundongos infectados. Microglias são células originárias de macrófagos/monócitos e, quando ativadas por diferentes estímulos patogênicos, como aos associados à malária (sequestro de células inflamatórias nos vasos cerebrais de animais com MCE e ativação da microglia em todas as áreas do cérebro, demonstrando inflamação parenquimal cerebral), elas respondem de diversas maneiras, ocorrendo alterações morfológicas e liberação de mediadores inflamatórios [76]. A quantidade de microglias aumenta durante a MCE no hipocampo, área responsável pela consolidação da memória, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias [77,131]. O estudo de Guha et al. [131] também não mostrou diferença significativa na obtenção de memória entre animais com MCE e controles não infectados. O uso de uma única dose de um derivado de artemisinina, como o artesunato, diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex frontal em animais infectados com PbA, demonstrando melhoras nos sintomas neurológicos, o que talvez explique o porquê dos animais tratados do presente estudo terem demonstrado comportamento semelhante aos animais não infectados [134]. Diferentemente

de outros estudos que analisaram memória de curta e longa duração na MCE, foi observado tanto nos testes de reconhecimento de objetos quanto no de esQUIVA inibitória que ocorre déficit cognitivo após *clearance* parasitário pelo tratamento com artesunato ou cloroquina [78-80,130].

O planejamento e execução dos experimentos de comportamento no presente estudo partiram de fato da premissa de que animais que se recuperariam de MCE apresentariam déficit cognitivo, incluindo de memória. Assim sendo, nossa expectativa era a de que a estimulação da sGC poderia influenciar benéficamente na aquisição de memória, prevenindo ou revertendo tais danos, e tal hipótese se baseou em vários estudos que observam a presença de nNOS/sGC/PKG na geração de memória [135]. Num estudo administrando um bloqueador da sGC (LY 83583) na área bilateral intrahipocampal ocorreu total amnésia para esQUIVA inibitória quando dado imediatamente após o treino, mas o mesmo não ocorreu 30 minutos após o treino. Além disso, os ratos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória tiveram seus níveis de cGMP e atividade da PKG significativamente aumentados e, novamente, isso não foi observado 30 minutos após o treino, indicando que a cascata hipocampal cGMP/PKG está associada nos estágios iniciais de formação de memória em ratos [136]. Outro estudo utilizando um inibidor de nNOS (3-bromo-7-nitroindazol [3-Br 7-NI]) e o inibidor irreversível de sGC, ODQ, analisado por meio do teste de esQUIVA inibitória passiva, mostrou que a inibição de nNOS interrompe os processos de memória de trabalho e referência, prejudicando as estratégias usadas para resolver tarefas de aprendizagem. Os inibidores de nNOs e sGC aumentaram significativamente o número de erros e latência, tanto na performance de trabalho como na memória de referência, indicando que a interação nNOS-sGC pode ser necessária tanto no aprendizado emocional e nas memórias de trabalho e referência [137]. Em outro estudo de Komsuoglu-Celikyurt e colaboradores [138], foi testado o ativador de sGC YC-1 em ratos com quatro meses e 24 meses de idade, com doses diárias durante duas semanas, avaliando a memória de aprendizado por meio do labirinto aquático de Morris e esQUIVA passiva. O desempenho dos animais nos testes mostrou diferenças entre as idades, sugerindo que a ativação da via NO-sGC-cGMP desempenha um

importante papel no aprendizado emocional e espacial e nas funções de memória em ratos mais velhos. Utilizando o teste de reconhecimento de objetos e comparando com os resultados provenientes da administração de um inibidor de nNOS, de um inibidor de sGC, de um inibidor e um ativador de PKG e um doador de NO, Furini et al. [139] conseguiram demonstrar que a sinalização NO-sGC-PKG é essencial no hipocampo para a consolidação de memória em reconhecer objetos. Esses estudos citados demonstram a importância da ativação da sGC durante a consolidação de memória, tanto de longo como curto prazo. Se os animais com MCE tivessem apresentado déficit na aquisição de memória, o que seria evidenciado pelos animais tratados com veículo, é possível que o estimulador de sGC riociguat pudesse melhorar o desempenho na consolidação da memória ou até mesmo restaurá-la por completo, assemelhando-se aos animais não infectados.

Em resumo, o presente estudo demonstra que o riociguat pode afetar benéficamente o fluxo sanguíneo cerebral quando utilizado como terapia adjuvante ao artemeter em animais com MCE tardia, indicando que estimuladores de sGC podem substituir, eventualmente de maneira mais eficaz e segura, doadores de NO nesse tipo de terapia. Entretanto, estudos mais detalhados e explorando diferentes dosagens, vias e esquemas de tratamento são necessários para otimizar e maximizar os potenciais efeitos benéficos. É necessária a realização de medidas dos níveis de cGMP no cérebro e nos microvasos cerebrais, assim como em outros vasos, para confirmar que a administração dos ativadores e estimuladores de sGC está de fato tendo o efeito esperado nos alvos desejados.

## 6. CONCLUSÕES

Em geral, pode-se concluir que a modulação farmacológica da atividade enzimática da sGC é capaz de melhorar o fluxo sanguíneo cerebral em animais com malária cerebral e, portanto, tem potencial terapêutico para esse agravo. Entretanto, nas doses e esquemas testados as intervenções não foram capazes de impactar sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a sobrevivência. De maneira específica, conclui-se que:

1. Animais com MCE apresentam queda significativa no fluxo sanguíneo cerebral no 6º dia de infecção em relação ao fluxo sanguíneo de animais controles não infectados;

2. O antimalárico artemeter pode aumentar significativamente o fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora de sua administração;

3. Após 6 horas do tratamento com artemeter e riociguat ocorre aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral, quando comparado com animais tratados com artemeter e veículo;

4. O tratamento com artemeter e cinaciguat não induz aumento do fluxo sanguíneo cerebral após 1 hora e 6 horas do tratamento nas doses e esquemas realizados neste trabalho;

5. Durante a MCE ocorre quebra da barreira hematoencefálica, aumentando a sua permeabilidade, que não é revertida pelo tratamento com artemeter combinado com riociguat, cinaciguat ou veículo no período de 6 horas após o tratamento;

6. O riociguat administrado juntamente com o artemeter não altera a sobrevivência dos animais com MCE quando comparado ao tratamento com artemeter e veículo;

7. Animais resgatados da MCE pelo tratamento com artemeter, em combinação com riociguat ou veículo, não apresentam diferença significativa na locomotividade, ansiedade e memória de curto e longo prazos quando comparados a animais não infectados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ruppert E; Fox R; Barnes R. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional/evolutiva*. 7ª ed. São Paulo: Rocca, 2005. 1145 p.
- [2] Mutis M; Martinez-Espinosa F; Albuquerque B; Coura J. Malária. In: Coura JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol 1. Guanabara Koogan, 2005. 1132 p.
- [3] Rey L. *Parasitologia*. 4ª ed. Guanabara Koogan, 2008.
- [4] Ménard R.; Tavares J.; Cockburn I.; Markus M.; Zavala F.; Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*. 2013 Oct;11(10):701-12.
- [5] Formaglio P; Amino R. Looking for blood. *eLife*. 2015;4:e11284.
- [6] CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>
- [7] WHO. World Malaria Report 2015. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1)>
- [8] Brasil. Ministério da Saúde. Malária. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11343-informacoes-tecnicas>>
- [9] Brasil. Ministério da Saúde. Brasil tem o menor número de casos de malária dos últimos 35 anos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/04/brasil-tem-o-menor-numero-de-casos-de-malaria-dos-ultimos-35-anos>>
- [10] Brasil. Ministério da Saúde. Resumo epidemiológico Nacional Mensal. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados>>
- [11] Gama BE; Lacerda MV; Daniel-Ribeiro, CT; Ferreira-da-Cruz, MF. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 106(Suppl. I): 159-166, 2011

- [12] Cruz MF; Carvalho LJ; Daniel-Ribeiro CT. A imunologia da malária ou sobre como a resposta imune induzida pelo parasita pode estar enferma e até causar doença. In: COURA, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol 1. Guanabara Koogan, 2005. 1132 p.
- [13] Dondorp A; Nosten F; Stepniewska K; Day N; White N; South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) Group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005. 366: 717-725.
- [14] Dondorp AM; Fanello CI; Hendriksen IC; Gomes E; Seni A; Chhaganlal KD; Bojang K; Olaosebikan R; Anunobi N; Maitland K; Kivaya E; Agbenyega T; Nguah SB; Evans J; Gesase S; Kahabuka C; Mtove G; Nadjm B; Deen J; Mwanga-Amumpaire J; Nansumba M; Karema C; Umulisa N; Uwimana A; Mokuolu AO; Adedoyin OT; Johnson WB; Tshefu AK; Onyamboko MA; Sakulthaew T; Ngum WP; Silamut K; Stepniewska K; Woodrow CJ; Bethell D; Wills B; Oneko M; Peto TE; von Seidlein L; Day NP; White NJ; for the AQUAMAT Group. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010. 376: 1647-1657.
- [15] WHO – The World Health Organization. Severe Malaria. Tropical Medicine and International Health. 2014. 19 (Suppl. 1), 7–131
- [16] Sahu, P.; Satpathi, S.; Behera, P.; Mishra, S.; Mohanty, S.; Wassmer, S. Pathogenesis of cerebral malaria: new diagnostic tools, biomarkers, and therapeutic approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015 Oct 27;5:75.
- [17] Newton CR; Taylor TE; Whitten RO. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;58:673–683.
- [18] Miller LH; Ackerman HC; Su XZ; Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*. 2013;19:156–167.
- [19] De Souza JB; Hafalla JC; Riley EM; Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010; 137:755-772.

- [20] Taylor TE; Fu WJ; Carr RA; Whitten RO; Mueller JS; Fosiko NG; Lewallen S.; Liomba NG; Molyneux ME. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nature Medicine*. 2004;10,143–145.
- [21] Beare NA; Southern C; Chalira C; Taylor TE; Molyneux ME; Harding SP. Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. *Archives of Ophthalmology*. 2004;122:1141–1147.
- [22] Beare NA; Harding SP; Taylor TE; Lewallen S.; Molyneux ME. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009 Jan 15;199(2):263-71.
- [23] Silamut K; Phu NH; Whitty C; Turner GD; Louwrier K; Mai NT; Simpson JA; Hien TT.; White NJ. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *American Journal of Pathology*. 1999 Aug; 155:2.
- [24] Favre N; Laperousaz C; Ryffel B; Weiss NA; Imhof BA; Rudin W; Lucas R; Piquet PF. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. *Microbes and Infection*. 1999;1:961–968.
- [25] Faille D; El-Assad F; Alessi MC; Fusai T; Combes V; Grau GE. Platelet-endothelial cell interactions in cerebral malaria: the end of a cordial understanding. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 102:1093-1102.
- [26] Conroy AL; Phiri H; Hawkes M; Glover S; Mallewa M; Seydel KB; Taylor, TE; Molyneux ME; Kain KC. Endothelium-based biomarkers are associated with cerebral malaria in Malawian children: a retrospective case-control study. *PLoS One*. 2010;5:e15291
- [27] Combes V; Taylor TE; Juhan-Vaque I; Mège JL; Mwenechanya J; Tembo M; Grau GE; Molyneux ME. Circulating endothelial microparticles in Malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA*. 2004;291:2542–2544.
- [28] El-Assaad F; Wheway J; Hunt NH; Grau GE; Combes V. Production, fate and pathogenicity of plasma microparticles in murine cerebral malaria. *PLoS Pathogens*. 2014;10:e1003839
- [29] Wassmer SC; de Souza JB; Frère C; Candal FJ; Juhan-Vague I; Grau GE. TGF-beta-1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *The Journal of Immunology*. 2006;176:1180–1184

- [30] Obermeier B; Verma A; Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handbook of Clinical Neurology*. 2016;133:39-59.
- [31] Hora R; Kapoor P; Thind KK; Mishra PC. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. *Metabolic Brain Disease*. 2016 Jan 8; 31(2):225-37.
- [32] Medana IM; Turner GD. Human cerebral malaria and the blood brain barrier. *International Journal of Parasitology*. 2006;36:555–568
- [33] Brown H; Rogerson S; Taylor T; Tembo M; Mwenechanya J; Molyneux M; Turner G. Blood–brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;64:207–213.
- [34] Christensen SS; Eslick GD. Cerebral malaria as a risk factor for the development of epilepsy and other long-term neurological conditions: a meta-analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015;109:233-238.
- [35] Carter JA; Mung'ala-Odera V; Neville BG; Murira G; Mturi N; Musumba C; Newton CR. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2005;76:476–481.
- [36] 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 July;122(1): e92–e99.
- [37] Carter JA; Lees JA; Gona JK; Murira G; Rimba K; Neville BG; Newton CR. Severe falciparum malaria and acquired childhood language disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2006;48:51–57.
- [38] Boivin MJ; Bangirana P; Byarugaba J; Opoka RO; Idro R; Jurek AM; John CC. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*. 2007;119:e360–366.
- [39] Nelson D; Cox M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. Artmed, 2014. 1298 p.
- [40] Cerqueira NF; Yoshida WB. Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002 Dec;17(6).

- [41] Tennyson AG; Lippard SJ. Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. *Chemistry & Biology*. 2011 Oct 28; 18(10):1211-20.
- [42] Madigan M; Zuckerbraun B. Therapeutic potencial of the nitrite-generated NO pathway in vascular dysfunction. *Frontiers in Immunology*. 2013 Jul 2;4:174.
- [43] Alderton WK; Cooper CE; Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001 Aug; 357(Pt 3):593-615.
- [44] Förstermann U; Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012 Apr; 33(7):829-37, 837a-837d.
- [45] Förstermann U; Closs EI; Pollock JS; Nakane M; Schwarz P; Gath I; Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994 Jun; 23(6 Pt 2):1121-31.
- [46] Attwell D; Buchan AM; Charpak S; Lauritzen M; Macvicar BA; Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):232-43.
- [47] Oliveira-Paula GH; Lacchini R; Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: from biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*. 2016 Jan 10;575(2 Pt 3):584-99.
- [48] Silverthorn D. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 5ª ed. Artmed, 2010.
- [49] Jin RC; Loscalzo J. Vascular nitric oxide: formation and function. *Journal of Blood Medicine*. 2010 Aug 1; 2010(1):147-162.
- [50] Walford G; Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1,2112–2118.
- [51] Thomas SR; Chen K; Keaney JF Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277,6017–6024.
- [52] Pamplona A; Ferreira A; Balla J; Jeney V; Balla G; Epiphany S; Chora A; Rodrigues CD; Gregoire IP; Cunha-Rodrigues M; Portugal S; Soares MP; Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine*. 2007 Jun;13(6):703-10.

[53] Otterbein LE; Soares MP; Yamashita K; Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology*. 2003 Aug;24(8):449-55.

[54] Derbyshire ER; Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annual Review of Biochemistry*. 2012;81:533-59.

[55] Cramer JP; Nüssler AK; Ehrhardt S; Burkhardt J; Otchwemah RN; Zanger P; Dietz E; Gellert S; Bienzle U; Mockenhaupt FP. Age dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria. *Tropical Medicine and International Health*. 2005;10:672–680.

[56] Pacher P; Beckman JS; Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 2007;87:315–424

[57] Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2001;1504:46–57

[58] 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. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;184: 557-567.

[59] Lopansri BK; Anstey NM; Weinberg JB; Stoddard GJ; Hobbs MR; Levesque MC; Mwaikambo ED; Granger DL. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet*. 2003;361 : 676 – 678 .

[60] Rother RP; Bell L; Hillmen P; Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005;293:1653-1662.

[61] Yeo TW; Lampah DA; Tjitra E; Gitawati R; Darcy CJ; Jones C; Kenangalem E; McNeil YR; Granger DL; Lopansri BK; Weinberg JB; Price RN; Duffull SB; Celmajer DS; Anstey NM. Increased asymmetric dimethylarginine in severe falciparum malaria: association with impaired nitric oxide bioavailability and fatal outcome. *PLoS Pathogens*. 2010; 6: e1000868.

[62] Weinberg JB; Yeo TW; Mukemba JP; Florence SM; Volkheimer AD; Wang H; Chen Y; Rubach M; Granger DL; Mwaikambo ED; Anstey NM.

Dimethylarginines: endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis in children with falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014 Sep 15;210(6):913-22.

[63] Yeo TW; 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. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007 Oct 29;204(11):2693-704.

[64] Carvalho LJ; Moreira AS; Daniel-Ribeiro CT; Martins YC. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):577-588.

[65] Yeo TW; 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. Recovery of endothelial function in severe falciparum malaria: relationship with improvement in plasma L-arginine and blood lactate concentrations. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;198:602-608.

[66] Yeo TW; Lampah DA; Rooslamia I; Gitawati R; Tjitra E; Kenangalem E; Price RN; Duffull SB; Anstey NM. A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS ONE*. 2013; 8: e69587.

[67] Rest JR. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1982;76:3.

[68] De Souza JB; Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection*. 2002; 4:291–300.

[69] White NJ; Turner GD; Medana IM; Dondorp AM; Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends in Parasitology*. 2010 Jan;26(1):11-5.

[70] Carvalho LJ. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends in Parasitology*. 2010 Jun;26(6):271-2.

[71] Hunt NH; Grau GE; Engwerda C; Barnum SR; van der Heyde H; Hansen DS; Schofield L; Golenser J. Murine cerebral malaria: the role story. *Trends in Parasitology*. 2010 Jun;26(6):272-4.

- [72] Stevenson MM; Gros P; Olivier M; Fortin A; Serghides L. Cerebral malaria: human versus mouse studies. *Trends in Parasitology*. 2010 Jun;26(6):274-5.
- [73] Martins, Y.; Smith, M.; Pelajo-Machado, M.; Werneck, G.; Lenzi, H.; Daniel-Ribeiro, C.; Carvalho, L. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *International Journal of Experimental Pathology*. 2009; 90:119-130.
- [74] Cabrales P; Zanini GM; Meays D; Frangos JA; Carvalho LJ. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *The American Journal of Pathology*. 2010 Mar;176:3
- [75] Cabrales P; Martins YC; Ong PK; Zanini GM; Frangos JA; Carvalho LJ. Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. *Virulence*. 2013 Nov 15;4:8, 686-697.
- [76] 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;197:1621–1627.
- [77] de Miranda AS; Brant F; Campos AC; Vieira LB; Rocha NP; Cisalpino D; Binda NS; Rodrigues DH; Ransohoff RM; Machado FS; Rachid MA; Teixeira AL. Evidence for the contribution of adult neurogenesis and hippocampal cell death in experimental cerebral malaria cognitive outcome. *Neuroscience*. 2015 Jan 22;284:920-33.
- [78] Reis PA; Estado V; da Silva, T; d'Avila JC; Siqueira LD; Assis EF; Bozza PT; Bozza FA; Tibiriça EV; Zimmerman GA; Castro-Faria-Neto HC. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathogens*. 2012 Dec;8(12):e1003099.
- [79] Reis PA; Comim CM; Hermani F; Silva B; Barichello T; Portella AC; Gomes FC; Sab IM; Frutuoso VS; Oliveira MF; Bozza PT; Bozza FA; Dal-Pizzol F; Zimmerman GA; Quevedo J.; Castro-Faria-Neto HC. Cognitive dysfunction is Sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathogens*. 2010 Jun;6(6): e1000963.
- [80] Campos AC; Brant F; Miranda AS; Machado FS; Teixeira AL. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. *Neuroscience*. 2015 Mar; 289:166-180.

- [81] Desruisseaux MS; Machado FS; Weiss LM; Tanowitz HB; Golightly LM. Cerebral malaria: a vasculopathy. *The American Journal of Pathology*. 2010 Mar;176(3):1075-8.
- [82] Ponsford MJ; Medana IM; Prapansilp P; Hien TT; Lee SJ; Dondorp AM; Esiri MM; Day NP; White NJ; Turner GD. Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012;205:663-71.
- [83] Cabrales P; Carvalho LJ. Intravital microscopy of the mouse brain microcirculation using a closed cranial window. *Journal of Visualized Experiments*. 2010 Nov 18;(45). pii: 2184.
- [84] Martins YC; Clemmer L; Orjuela-Sánchez P; Zanini GM; Ong PK; Frangos, JA; Carvalho LJ. Slow and continuous delivery of a low dose of nimodipine improves survival and electrocardiogram parameters in rescue therapy of mice with experimental cerebral malaria. *Malaria Journal*. 2013;12:138.
- [85] 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. *Nature Medicine*. 2006 Dec; 12(12):1417-22.
- [86] Cabrales P; Zanini GM; Meays D; Frangos JA; Carvalho LJ. Nitric Oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;203:1454–63.
- [87] Zanini GM; Cabrales P; Barkho W; Frangos JÁ; Carvalho LJ. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during Plasmodium berghei ANKA infection in mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2011 Jun 7;8(1):66.
- [88] Zanini GM; Martins YC; Cabrales P; Frangos JA; Carvalho LJ. S-nitrosoglutathione prevents experimental cerebral malaria. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2012 Jun;7(2):477-87.
- [89] Orjuela-Sánchez P; Ong PK; Zanini GM; Melchior B; Martins YC; Meays D; Frangos JA; Carvalho LJ. Transdermal glyceryl trinitrate as an effective adjunctive treatment with artemether for late-stage experimental cerebral malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013 Nov; 57(11):5462-71.

- [90] Ong PK; Melchior B; Martins YC; Hofer A; Orjuela-Sánchez P; Cabrales P; Zanini GM; Frangos JA; Carvalho LJ. Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathogens*. 2013; 9(6): e1003444.
- [91] Follmann M; Griebenow N; Hahn MG; Hartung I; Mais FJ; Mittendorf J; Schäfer M; Schirok H; Stasch JP; Stoll F; Straub A. The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013 Sep 2;52(36):9442-62.
- [92] Dasgupta, A; Bowman L; D'Arsigny CL; Archer ST. Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2015 Jan;97(1):88-102.
- [93] Jabs A; Oelze M; Mikhed Y; Stamm P; Kröller-Schön S; Welschhof P; Jansen T; Hausding M; Kopp M; Steven S; Schulz E; Stasch JP; Münzel T; Daiber A. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. *Vascular Pharmacology*. 2015 Aug;71:181-91.
- [94] Thoonen R; Cauwels A; Decaluwe K; Geschka S; Tainsh RE; Delanghe, J.; Hochepeid T; de Cauwer L; Rogge E; Voet S; Sips P; Karas RH; Bloch KD; Vuylsteke M; Stasch, JP; Van de Voorde J; Buys ES; Brouckaert P. Cardiovascular and pharmacological implications of haem-deficient NO-unresponsive soluble guanylate cyclase knock-in mice. *Nature Communications*. 2015 Oct 7; 6:8482.
- [95] Kalk P; Godes M; Relle K; Rothkegel C; Hucke A; Stasch JP; Hoher B. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *British Journal of Pharmacology*. 2006 Jul;148(6):853-9.
- [96] Salloum FN; Das A; Samidurai A; Hoke NN; Chau VQ; Ockaili RA; Stasch JP; Kukreja RC. Cinaciguat, a novel activator of soluble guanylate cyclase, protects against ischemia/reperfusion injury: role of hydrogen sulfide. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2012 Mar 15;302(6):H1347-54.
- [97] Vandendriessche B; Rogge E; Goossens V; Vandenabeele P; Stasch JP; Brouckaert P; Cauwels A. The soluble guanylate cyclase activator BAY 58-2667 protects against morbidity and mortality in endotoxic shock by recoupling organ systems. *PLoS ONE*. 2013 Aug 28;8(8):e72155.

[98] Lang M; Kojonazarov B; Tian X; Kalymbetov A; Weissmann N; Grimminger F; Kretschmer A; Stasch JP; Seeger W; Ghofrani HA; Schermuly RT. The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e43433.

[99] Ghofrani HA; Staehler G; Grünig E; Halank M; Mitrovic V; Unger S; Mueck W; Frey R; Grimminger F; Schermuly RT; Behr J. Acute effects of riociguat in borderline or manifest pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Circulation*. 2015 Jun;5(2):296-304.

[100] Sharkovska Y; Kalk P; Lawrenz B; Godes M; Hoffmann LS; Wellkisch K; Geschka S; Krause-Relle K; Hocher B; Stasch JP. Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase reduces organ damage in experimental low-renin and high-renin models. *Journal of Hypertension*. 2010 Aug;28(8):1666-75.

[101] Dees C; Beyer C; Distler A; Soare A; Zhang Y; Palumbo-Zerr K; Distler O; Schett G; Sandner P; Distler JH. Stimulators of soluble guanylate cyclase (sGC) inhibit experimental skin fibrosis of different aetiologies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015 Aug;74(8):1621-5.

[102] Clemmer L; Martins YC; Zanini GM; Frangos JA; Carvalho LJ. Artemether and Artesunate Show the Highest Efficacies in Rescuing Mice with Late-Stage Cerebral Malaria and Rapidly Decrease Leukocyte Accumulation in the Brain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Apr;55(4):1383-90.

[103] Geschka S; Kretschmer A; Sharkovska Y; Evgenov OV; Lawrenz B; Hucke A; Hocher B; Stasch JP. Soluble Guanylate Cyclase Stimulation Prevents Fibrotic Tissue Remodeling and Improves Survival in Salt-Sensitive Dahl Rats. *PLoS One*. 2011 Jul 18;6(7):e21853.

[104] Ott IM; Alter ML; von Websky K; Kretschmer A; Tsuprykov O; Sharkovska Y; Krause-Relle K; Raila J; Henze A; Stasch JP; Hocher B. Effects of Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase on Diabetic Nephropathy in Diabetic eNOS Knockout Mice on Top of Angiotensin II Receptor Blockade. *PLoS One*. 2012 Aug 10;7(8):e42623.

[105] Ayata C; Dunn AK; Gursoy-Özdemir Y; Huang Z; Boas DA; Moskowitz MA. Laser Speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2004 Jul;24(7):744-55.

- [106] Dunn AK. Laser Speckle Contrast Imaging of cerebral blood flow. *BioMedical Engineering*. 2012 Feb; 40(2): 367–377.
- [107] Hara K; Harris RA. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-Ggated ion channels. *Anesthetic Pharmacology* 2002;94:313–8
- [108] Saunders NR; Dziegielewska KM; Mollgard K; Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans-blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*. 2015 Oct; 9:385
- [109] Burke SN; Ryan L; Barnes CA. Characterizing cognitive aging of recognition memory and related processes in animal models and in humans. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2012 Sep 12;4:15.
- [110] Ennaceur A; Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behavioural Brain Research*. 1992;51:83–92.
- [111] Schmitt U; Hiemke C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1998 Apr;59(4):807-11.
- [112] Royce J. On the construct validity of open-field measures. *Psychological Bulletin*. 1977; 84:6.
- [113] Bali A; Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *European Journal of Pharmacology*. 2015 Jan 5;746:282-92.
- [114] Almeida RF; Ganzella M; Machado DG; Loureiro SO; Leffa D; Quincozes-Santos A; Pettenuzzo LF; Duarte MM; Duarte T; Souza DO. Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2017 Feb 20;76:1-11.
- [115] Kazlauckas V; Pagnussat N; Mioranza S; Kalinine E; Nunes F; Pettenuzzo L; Souza DO; Portela LV; Porciúncula LO; Lara DR. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiology & Behavior*. 2011 Mar 28;102(5):475-80.

[116] Borba Filho GL; Zenki KC; Kalinine E; Baggio S; Pettenuzzo L; Zimmer ER; Weis SN; Calcagnotto ME; Onofre de Souza D. A new device for step-down inhibitory avoidance task – effects of low and high frequency in a novel device for passive inhibitory avoidance task that avoids bioimpedance variations. *PLoS ONE*. 2015 Feb 23;10(2):e0116000.

[117] Penet MF; Viola A; Confort-Gouny S; Le Fur Y; Duhamel G; Kober F; Ibarrola D; Izquierdo M; Coltel N; Gharib B; Grau GE; Cozzone PJ. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *Journal of Neuroscience*. 2005 Aug 10;25(32):7352-8.

[118] English MC; Waruiru C; Lightowler C; Murphy SA; Kirigha G; Marsh K. Hyponatraemia and dehydration in severe malaria. *Archives in Disease Child*. 1996 Mar;74(3):201-5.

[119] Maitland K; Pamba A; Newton CR; Levin M. Response to volume resuscitation in children with severe malaria. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2003 Oct;4(4):426-31.

[120] Okorji UP; Velagapudi R; El-Bakoush A; Fiebich BL; Olajide OA. Antimalarial drug artemether inhibits neuroinflammation in BV2 microglia through Nrf2-dependent mechanisms. *Molecular Neurobiology*. 2016 Nov;53(9):6426-6443.

[121] Solomon W; Wilson NO; Anderson L; Pitts S; Patrickson J; Liu M; Ford BD; Stiles JK. Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria. *Journal of Neuroinflammation*. 2014 Jan 17;11:9.

[122] Stasch JP; Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2013; 218:279-313.

[123] Stasch JP; Schmidt PM; Nedvetsky PI; Nedvetskaya TY; H S AK; Meurer S; Deile M; Taye A; Knorr A; Lapp H; Müller H; Turgay Y; Rothkegel C; Tersteegen A; Kemp-Harper B; Müller-Esterl W; Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006 Sep;116(9):2552-61.

[124] Evgenov OV; Kohane DS; Bloch KD; Stasch JP; Volpato GP; Bellas E; Evgenov NV; Buys ES; Gnoth MJ; Graveline AR; Liu, R.; Hess DR; Langer R; Zapol WM. Inhaled agonists of soluble guanylate cyclase induce selective pulmonary vasodilation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007 Dec 1;176(11):1138-45.

[125] Radovits T; Korkmaz S; Miesel-Gröschel C; Seidel B; Stasch JP; Merkely B; Karck M; Szabó G. Pre-conditioning with the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat reduces ischaemia-reperfusion injury after cardiopulmonary bypass. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011 Feb;39(2):248-55.

[126] Dautzenberg M; Kahnert A; Stasch JP; Just A. Role of soluble guanylate cyclase in renal hemodynamics and autoregulation in the rat. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*. 2014 Nov 1; 307(9):F1003-12.

[127] Sporbert A; Mertsch K; Smolenski A; Haseloff RF; Schönfelder G; Paul M; Ruth P; Walter U; Blasig IE. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein: a consequence of nitric-oxide-and cGMP-mediated signal transduction in brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 1999 Apr 20;67(2):258-66.

[128] Utepbergenov DI; Mertsch K; Sporbert A; Tenz K; Paul M; Haseloff RF; Blasig IE. Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation-mediated injury. *FEBS Letters*. 1998 Mar 13;424(3):197-201.

[129] Wong D; Dorovini-Zis K; Vincent SR. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Experimental Neurology*. 2004 Dec;190(2):446-55.

[130] Dai M; Reznik SE; Spray DC; Weiss LM; Tanowitz HB; Gulinello M; Desruisseaux MS. Persistent and cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes and Infection*. 2010 Dec;12(14-15):1198-207.

[131] Guha SK; Tillu R; Sood A; Patgaonkar M; Nanavaty IN; Sengupta A; Sharma S; Vaidya VA; Pathak S. Single episode of mild murine malaria induces neuroinflammation, alters microglial profile, impairs adult neurogenesis, and causes deficits in social and anxiety-like behavior. *Brain, Behaviour and Immunity*. 2014 Nov;42:123-37.

[132] Bear M; Connors B; Paradiso M. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 857p.

[133] Bertinaria M; Orjuela-Sanchez P; Marini E; Guglielmo S; Hofer A; Martins YC; Zanini GM; Frangos JA; Gasco A; Fruttero R; Carvalho LJ. NO-Donor Dihydroartemisinin Derivatives as Multitarget Agents for the Treatment of Cerebral Malaria. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 8;58(19):7895-9.

[134] Miranda AS; Brant F; Rocha NP; Cisalpino D; Rodrigues DH; Souza DG; Machado FS; Rachid MA; Teixeira AL Jr; Campos AC. Further evidence for an anti-inflammatory role of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malaria Journal*. 2013 Nov 2;12:388.

[135] Zhou L; Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 2009 Jun;20(4):223-30.

[136] Bernabeu R; Schronder N; Quevedo J; Cammarota M; Izquierdo I; Medina JH. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *NeuroReport*. 1997 Jul 7;8(9-10):2221-4.

[137] Komsuoglu-Celikyurt I; Gocmez SS; Mutlu O; Gacar N; Aricioglu F; Utkan T. Evidence for the involvement of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase on cognitive functions in rats. *Life Sciences*. 2011 Dec 5;89(23-24):905-10.

[138] Komsuoglu-Celikyurt I; Utkan T; Ozer C; Gacar N; Aricioglu F. Effects of YC-1 on learning and memory functions of aged rats. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2014 Aug 21;20:130-7.

[139] Furini CR; Rossato JI; Bitencourt LL; Medina JH; Izquierdo I; Cammarota M. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*. 2010 May;20(5):672-83.

## 8. APÊNDICES E/OU ANEXOS

### Apêndice A – Licença CEUA



Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

**LICENÇA**

**L-037/2015**

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-035/2015), intitulado “Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias adjuvantes para malária cerebral experimental”, sob a responsabilidade de **LEONARDO JOSÉ MOURA DE CARVALHO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 30/06/2019

**Camundongo, cepa:**

C57Bl/6 - 9935 animais fêmeas – 8-10 semanas – 20g

**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2015.

Flávio Alves Lara

**Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz  
Fundação Oswaldo Cruz**

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056